

Aus Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Die Rolle der Cyclooxygenase-2 bei der Invasion des malignen Melanoms

Zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Martin Köbel
aus Magdeburg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Hauptmann
 2. Prof. Dr. med. H. Kuehn
 3. Prof. Dr. med. D. Schadendorf

Datum der Promotion: 18.06.2001

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Arachidonsäurestoffwechsel	1
1.1.1	membranäre Prostaglandinrezeptoren	3
1.1.2	nukleäre Prostaglandinrezeptoren	5
1.2	Zwei Isoformen der Cyclooxygenase	7
1.3	Cyclooxygenase und Entzündung	9
1.4	COX-2 und maligne Tumore.....	10
1.4.1	Tumoriniation und Tumorpromotion	13
1.4.2	Tumorzellproliferation	14
1.4.3	Progression	15
1.4.4	molekularer Mechanismus	16
1.4.4.1	Interaktion mit membranären Prostaglandinrezeptoren	16
1.4.4.2	Interaktion mit nukleären Prostaglandinrezeptoren.....	18
1.4.4.3	Prostaglandin-unabhängiger Mechanismus.....	18
1.4.4.4	Non-COX-Target.....	19
1.5	Malignes Melanom.....	22
2	Zielstellung.....	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Antikörper, Chemikalien und Kits	24
3.2	Instrumente und Verbrauchsmaterial	25
3.3	Gele, Puffer und Lösungen.....	25
3.4	Zelllinien und Zellkultur	27
3.5	Western Blot.....	27
3.6	PGE ₂ -ELISA	28
3.7	Proliferationsassay.....	28
3.8	Matrigel-Invasionsassay	29
3.9	Zymogramm	30

4	Ergebnisse	31
4.1	COX-Protein Expression.....	31
4.2	Prostaglandin E ₂ -Biosynthese	31
4.3	Inhibition der Matrigel-Invasion durch NS 398	34
4.4	Korrelationen zwischen NS 398 Einfluss auf Invasivität und PGE ₂ -Produktion.....	36
4.5	Proliferationseinfluss von NS 398 und PGE ₂	37
4.6	NS 398 und MMP-2 und -9.....	41
5	Diskussion	42
5.1	Expression von COX-2 Protein in Melanomzelllinien	42
5.1.1	Ursachen der erhöhten COX-2 Expression in malignen Tumoren.....	43
5.2	PGE ₂ -Biosynthese in Melanomzelllinien.....	46
5.3	Proliferationseinfluss von NS 398 und PGE ₂	46
5.4	Inhibition der Matrigelinvasion durch NS 398.....	47
5.4.1	Prostaglandin-unabhängiger Mechanismus.....	48
5.5	Ausblick	49
6	Zusammenfassung.....	50
7	Literaturverzeichnis.....	52
8	Erklärung an Eides Statt	64

1 Einleitung

Seit Anfang der 80^{er} Jahre ist bekannt, dass postoperative Entzündungsprophylaxe mit dem nicht-steroidalen Antirheumatikum (NSAID) Sulindac bei Patienten mit familiärer Adenomatosis coli (FAP) die Anzahl und Größe neu auftretender Adenome reduziert (**Waddell and Loughry 1983**). Aus Tierversuchen wusste man schon seit 1978 von der Unterdrückung der Tumorinduktion durch NSAIDs bei kolorektalen aber auch anderen Karzinomen und Sarkomen (**Lynch et al. 1978, Pollard and Luckert 1981**). Danach wurde in prospektiven epidemiologischen Studien gezeigt, dass die Einnahme von NSAIDs das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken um nahezu die Hälfte senkt (**Thun et al. 1993**).

1.1 Arachidonsäurestoffwechsel

Die antiinflammatorischen, antipyretischen und analgetischen Effekte der NSAIDs beruhen auf der Hemmung der Cyclooxygenase (COX), welche neben der Lipoxygenase das Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels darstellt (Abb.1).

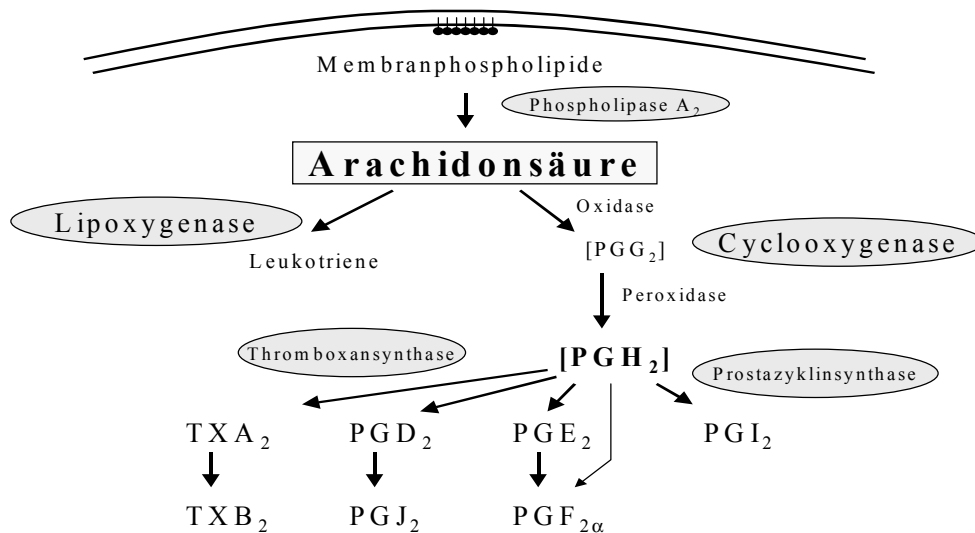


Abbildung 1: Arachidonsäurestoffwechsel

Die Arachidonsäure (Eikosatetraensäure) ist der wichtigste Vertreter der Gruppe mehrfach ungesättigter C-20-Fettsäuren (Eikosaene). Sie wird durch die Phospholipase A₂ aus ihren intrazellulären Speichern, den Membranphospholipiden, abgespalten und stellt bei durchschnittlicher mitteleuropäischer Kost das wesentliche Substrat der COX dar. Die COX ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym für eine Kaskade von Reaktionen, aus welchen Moleküle entstehen, die als zentrales Strukturelement die Prostanoidsäure enthalten (Abb. 2).

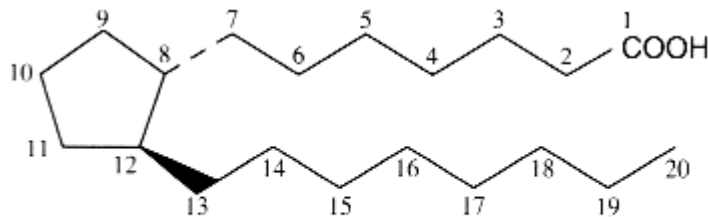


Abbildung 2: Struktur der Prostanoidsäure

Die entstandenen Moleküle, Prostaglandine und Thromboxane, werden als Prostanoiden zusammengefasst, häufig vereinfacht aber auch nur Prostaglandine (PG) genannt. Diese Bezeichnungen gehen darauf zurück, dass sie irrtümlicherweise für ein Sekret der Prostata gehalten wurden.

Die COX katalysiert in zwei Schritten die Umwandlung der Arachidonsäure (AA) zu dem intermediären Prostaglandin H₂ (PGH₂). Im ersten Schritt erhält die Arachidonsäure durch oxidative Zyklisierung unter Verlust von zwei Doppelbindungen einen zentralen C-5 Ring. In einem zweiten Schritt wird das Zwischenprodukt Prostaglandin G₂ durch die Peroxidaseaktivität des Enzyms zu PGH₂ reduziert. Aus diesem Grund existieren für die COX synonyme Bezeichnungen wie Prostaglandin-Endoperoxidase-Synthase oder PGH-Synthase (**Smith and Marnett 1991**). Welche der heute über einhundert bekannten Prostaglandine, die sich hinsichtlich ihrer funktionellen Gruppe (Abb. 3) unterscheiden, aus der Vorstufe PGH₂ konvertiert werden, hängt von der weiteren enzymatischen Ausstattung der Zellen ab. Die Nomenklatur der Prostaglandine basiert auf der Vergabe von Buchstaben für die funktionelle Gruppe und einer Nummerierung, welche die Anzahl der Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette bezeichnet. Aus anderen Substraten der COX, wie Eikosatriensäure, entstehen die Prostaglandine der Serie 1 (PG₁), aus Eikosapentaensäure diejenigen der Serie 3 (PG₃).

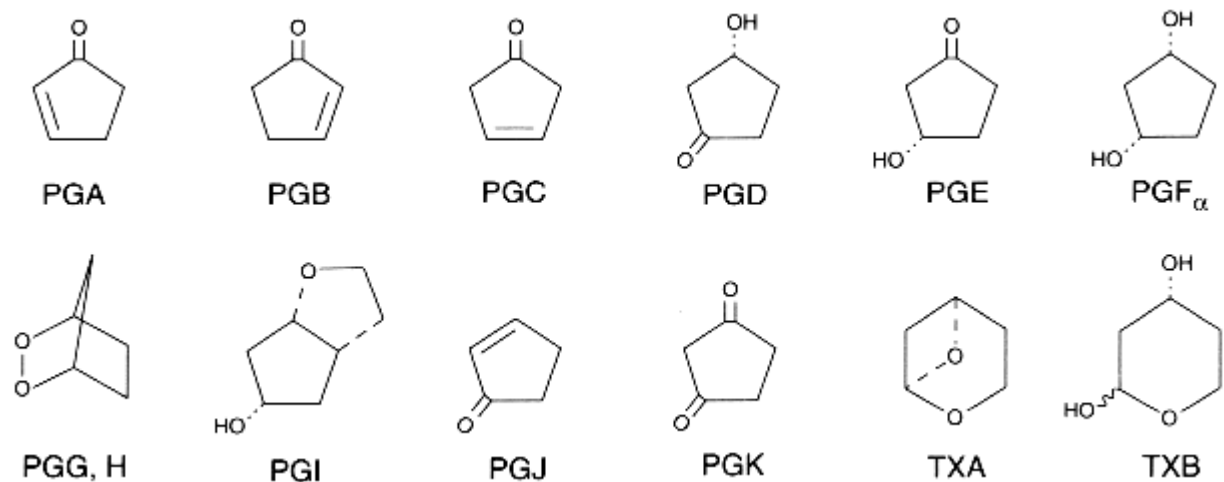


Abbildung 3: Funktionelle Gruppen der wichtigsten Prostaglandine und Thromboxane

Die höchsten Konzentrationen für PGE₂ und PGF_{2α} wurden in Niere, Herz und Milz gemessen, PGD₂ stammt hauptsächlich aus Mastzellen. PGI₂, bekannt auch als Prostacyclin, wird vorwiegend von Endothelzellen und TXA₂ von Thrombozyten gebildet (Marnett 1992, DuBois et al. 1998, Taketo 1998).

1.1.1 membranäre Prostaglandinrezeptoren

Prostaglandine wirken autokrin sowie parakrin und damit lokal am Ort ihrer Synthese. Sie werden hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und aus der Zelle geschleust. Ungewöhnlich für lipophile Substanzen sind die spezifischen Rezeptoren der Prostaglandine an der Zellmembran lokalisiert. PGE₂ bindet an eine Gruppe von G-Proteingekoppelten Rezeptoren (EP2-4) und wirkt je nach Art des Rezeptor-G-Protein Komplexes stimulierend (G_s) oder inhibierend (G_i) auf den second messenger cAMP. Der PGE₂ Rezeptor EP1 erhöht dagegen die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration über G-Proteine der G_q-Familie. Damit lässt sich die Diversität der PGE₂ Wirkungen in verschiedenen Geweben erklären. Der PGF_{2α} Rezeptor besitzt zwei alternativ gespleißte Isoformen FP_A und FP_B mit ähnlicher Wirkung. Als second messenger dienen Inositol-Trisphosphat (IP₃), welches Ca²⁺ mobilisiert, und Diacylglycerol, welches die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Tab.1, Narumiya et al. 1999). Wie andere bioaktive Lipide haben Prostaglandine eine sehr kurze Halbwertszeit *in vivo*. So wird TXA₂ zum Beispiel innerhalb von Minuten in das stabile aber inaktive TXB₂ überführt.

Tabelle 1: membranäre Prostaglandinrezeptoren nach **Narumiya et al. 1999**

Rezeptor	Ligand	Signaltrans- duktion	Gewebeverteilung der Rezeptoren	Funktion
DP	PGD ₂	G _S - cAMP	Thrombozyten, Gefäßmuskel, Darm Nervengewebe	Inhibition der Aggregation Relaxation glatter Muskulatur Promotion des Schlafes
EP1	PGE ₂	G _q - Ca ²⁺	Niere, Lunge, Milz, Hoden, Uterus	Kontraktion glatter Muskulatur
EP2	PGE ₂	G _S - cAMP	Lunge, Plazenta	Relaxation glatter Muskulatur
EP3	PGE ₂	G _I - cAMP- Hemmung	Magen, Niere Uterus, Hoden, Lunge, Nebenniere, GIT	Hemmung der Säureproduktion Hemmung der Wasserabsorption Uteruskontraktion Kontraktion glatter Muskulatur
EP4	PGE ₂ , PGE ₁	G _S - cAMP	GIT, Lunge, Uterus, Monozyten, Thymus, Niere, Gehirn, Herz	Relaxation glatter Muskulatur Chemotaxis
FP _{A/B}	PGF _{2α}	IP ₃ + Ca ²⁺ PKC	Uterus Gelbkörper Lunge	Uteruskontraktion Luteolyse Bronchuskontraktion
IP	PGI ₂	G _S - cAMP	Thrombozyten Gefäßmuskel Thymus Niere, Leber, Lunge	Hemmung der Aggregation Vasodilatation Verminderung der T-Zell- Proliferation
TP	TXA ₂	IP ₃ + Ca ²⁺	Thrombozyten Gefäßmuskel Lunge Thymus, Milz, Niere, Herz	Thrombozytenaggregation Vasokonstriktion Bronchuskontraktion

1.1.2 nukleäre Prostaglandinrezeptoren

Aus älteren elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass cholesterinsenkende Fibrate zu einer Proliferation von Peroxisomen führen. Als Mediatoren dieses Effekts wurden Anfang der 90^{er} Jahre die „peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs) identifiziert. Die Besonderheit dieser nukleären Rezeptoren besteht darin, dass sie mit dem 9-cis-Retinoidsäurerezeptor (RXR, Retinoid X Rezeptor), ein Heterodimer bilden und als solches an ein sequenzspezifisches Response-Element binden. Die Ligandenbindung an dieses Heterodimer führt zur Induktion der Transkription. Die bisher beschriebenen PPAR-Liganden sind in Tabelle 2 aufgeführt. An dieses Heterodimer binden sowohl PPAR-Liganden als auch RXR-Liganden, wobei die Bindung beider Liganden zu einer Potenzierung der Aktivität führt.

Drei PPAR Isotypen wurden in Vertebraten bisher nachgewiesen: α , δ (auch β und NUC1 genannt) und γ . Sie unterscheiden sich durch ihre Gewebeexpression, Aktivatoren und Zielgene und die damit verbundenen Funktionen (Tab. 2, **Kersten et al. 2000**).

Synthetische Agonisten für PPAR α γ (Fibrate) und PPAR γ (Thiazolinedione, TZDs) werden in der Therapie des metabolischen Syndroms eingesetzt. Neue TZDs wie Rezulin und Avandia besitzen antidiabetische Effekte bei Typ II Diabetikern. Der Wirkmechanismus des antidiabetischen Effekts der TZDs verläuft über die PPAR γ -vermittelte Speicherung von Fettsäuren im Fettgewebe und einer damit verbundenen Verbesserung der Insulinwirkung am Muskel.

Darüber hinaus sind PPAR α und PPAR γ in die Atherogenese involviert. PPAR α senkt die Plasmakonzentration von Lipoproteinen und proatherosklerotischen Proteinen wie Fibrinogen und CRP. PPAR γ fördert einerseits die Bildung von Schaumzellen, andererseits erhöht er durch Verminderung der Gefäßwandentzündung die Plaquestabilität (**Kersten et al. 2000**).

Schon lange ist bekannt, dass Tumorzellen vermehrt Peroxisomen enthalten, was darauf hinweist, dass PPARs in Tumoren abnorm aktiviert sind. Die Datenlage zur Rolle der PPARs in Tumoren ist jedoch kontrovers. Die tumorbiologische Bedeutung von PPAR α ist bisher unbekannt. PPAR γ Agonisten induzierten die Redifferenzierung von Liposarkomzellen und Mammakarzinomzellen, so dass die Aktivierung von PPAR γ eher einen negativen Effekt auf die Tumorprogression hat (**Kersten et al. 2000**).

PPAR δ wird in Abschnitt 1.4.6. genauer beschrieben.

Tabelle 2: PPARs nach **Kersten et al. 2000**

	PPAR α	PPAR γ	PPAR δ
Expression	braunes Fettgewebe Leber Niere, Herz, Skelettmuskel	Fettgewebe Kolon, Makrophagen, Endothel, glatte Muskulatur, Retina	ubiquitär v.a. in Darm, Niere, Herz
Agonisten	Linolsäure, AA, Clofibrat Leukotrien B ₄ GW7647	Linolsäure, AA TZD PGJ ₂	Linolsäure, AA PGI ₂ GW2433
aktivierte Zielgene im Fettstoffwechsel	z.B. Carnitin- Palmitoyl-Transferase I Apolipoprotein AI, AII	Lipoproteinlipase Acyl-CoA-Synthase	Acyl-CoA-Synthase-2
metabolische Funktion	Katabolismus der Fettsäure in der Leber	Speicherung der Fettsäuren im Fettgewebe	unbekannt
Rolle bei der Entzündung	Hemmung der Transkription von iNOS, COX-2; Hemmung und Stimulation von TNF α	Hemmung der Transkription von Il-2, Il-6, Il-8, COX-2	unbekannt
inflammatorische Wirkung	widersprüchlich	antiinflammatorisch	unbekannt
Rolle bei malignen Tumoren	unbekannt	Hemmung der Tumorprogression	Förderung der Tumorprogression

1.2 Zwei Isoformen der Cyclooxygenase

Seit Anfang der 90^{er} Jahre ist bekannt, dass zwei Isoformen der COX existieren: COX-1 und -2 (Xie et al. 1991). Sie werden von verschiedenen Genen kodiert und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung und Expressionsregulation. COX-1 wird konstitutiv unter anderem in Niere, Magen, Thrombozyten und Gefäßendothel exprimiert und kann als sogenanntes "house-keeping enzyme" schnelle physiologische Adaptationen einleiten. Die COX-1 generiert vasodilatierende Prostaglandine, welche den renalen Blutfluss sowie die Mikrozirkulation in der Magenschleimhaut bei systemischer Vasokonstriktion aufrechterhalten (Marnett 1992). Die Bildung von Thromboxan A₂ durch aktivierte Thrombozyten fördert deren Aggregation und wirkt zudem gefäßverengend. Zur Aufrechterhaltung der normalen Hämostase sezernieren Endothelzellen den potenten TXA₂-Gegenspieler PGI₂ (Schafer 1995).

Die COX-2 wird in den meisten Geweben nicht konstitutiv exprimiert, sondern kann durch Interleukin-1 β (Il-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und andere Zytokine induziert werden. Glukocortikoide und antiinflammatorische Zytokine wie Il-4 und Il-10 hemmen die Expression des Enzyms. Durch die verzögerte Induktion wirkt die COX-2 auf Prozesse wie Entzündung, Mitose und Ovulation sekundär verstärkend. Als Beispiel für die COX-2-Induktion im Rahmen eines physiologischen Prozesses sei die Ovulation angeführt. Hier aktiviert die COX-2 Proteasen, die zur Ruptur des Follikels führen (Tsafriri 1995). Eine konstitutive Expression der COX-2 findet sich in Gehirn, Hoden und Macula densa der Nieren (DeWitt and Smith 1995).

Tabelle 3: Unterschiede von COX-1 und COX-2 nach Taketo 1998

	COX-1	COX-2
Genlokus	9q32 – q33.3	1q25.2 – q25.3
Gengröße	22 kb	8 kb
	11 exons	10 exons
Größe der mRNA	2,8 kb	4,0 kb
Molekulargewicht der Proteine	85.000 Da	72.000 Da

Die Entwicklung von COX-knockout Mäusen weist darauf hin, dass die Funktionalität beider Enzyme weit verschiedenerer Art ist, als ursprünglich erwartet und wahrscheinlich auch

Pathways reguliert werden, die nichts mit der Prostaglandinsynthese zu tun haben. So sind COX-1-null Mäuse wenig beeinträchtigt, obwohl die Prostaglandinsynthese gegenüber normalen Versuchstieren um 99% erniedrigt ist. Dagegen besteht bei COX-2-null Mäusen eine hohe Frühsterblichkeit durch Peritonitis oder progressive Nephropathie, obwohl keine Alteration des Prostaglandinspiegels vorliegt. Weiterhin beobachtete man keine kompensatorische Hochregulation einer Isoform bei Wegfall der anderen (**Langenbach et al. 1999**).

Tabelle 4: Phänotypen von COX defizienten Mäusen nach **Langenbach et al. 1999**

Phänotyp	COX-1 defiziente Maus	COX-2 defiziente Maus
Allgemeine Gesundheit	relativ normal	schwere Beeinträchtigung
PG-Niveau	1% der Kontrolle	normal
	induzierbar	nicht induzierbar
Überleben	normal	60% überleben die ersten Wochen
Gastrointestinal	verminderte Heilung induzierter Ulzera	verminderte Heilung induzierter Ulzera
Entzündungsreaktion		
Air pouch Modell	gering verminderte Makrophagenrekutierung; gering verminderte Auflösung des Entzündungsexsudates	50 % verminderte Makrophagenrekutierung; stark verminderte Auflösung des Entzündungsexsudates
Infektionen	normal	vermehrt Peritonitis
Karzinogenese		
induzierte		
Hautpapillome	~ 75% reduziert	~ 75% reduziert
induzierte intestinale		
Adenome	~ 75% reduziert	~ 75% reduziert

1.3 Cyclooxygenase und Entzündung

1838 wurden aus Weidenrinde Salizinglykoside extrahiert und daraus die Salizylsäure isoliert. 1893 synthetisierte der deutsche Chemiker Felix Hoffmann, angespornt durch das Leiden seines Vaters an rheumatoider Arthritis, die azetylierte Form der Salizylsäure: Aspirin. Aus dieser Entdeckung entwickelte man eine ganze Reihe schmerzlindernder und zugleich antientzündlich wirkender NSAIDs, die auch heute noch zu den meist genutzten Arzneimitteln zählen. Den zellulären Wirkungsmechanismus der NSAIDs beschrieben Vane allerdings erst 1971 (**Vane 1971**). Allen NSAIDs gemeinsam ist die Hemmung der enzymatischen Aktivität der COX und damit eine Synthesehemmung von Prostaglandinen. Die oben beschriebene Identifizierung einer zweiten Isoform mit unterschiedlichen Eigenschaften erweckte das Interesse an deren selektiver pharmakologischer Hemmbarkeit. Es wurde vermutet, dass eine selektive Hemmung der COX-2 eine antiphlogistische Wirkung bei fehlender Beeinträchtigung der COX-1-abhängigen Funktionen entfalten könnte. Argumente wonach die COX-2 im besonderen Maße in das entzündliche Geschehen eingebunden ist, lieferten **Cao et al. 1997**, indem sie demonstrierten, dass der Fieberanstieg mit einer Expression der COX-2 in Rattenendothelzellen des Gehirns einhergeht. In Tiermodellen für die chronische Arthritis konnte eine klare Beziehung zwischen der COX-2 Induktion und der Prostaglandinproduktion im entzündeten Gelenk dargestellt werden (**Anderson et al. 1996**). Neue selektive COX-2 Inhibitoren werden heute als Standardtherapeutika in der Rheumatologie angewandt. Die COX-2-spezifischen Inhibitoren Celebrex (Celecoxib, SC-58635, Searle & Pfizer, Heumann) und Vioxx (Rofecoxib, MSD) sind nach erfolgreicher klinischer Prüfung für die Indikationen Arthroseschmerzen und chronische Polyarthrititis zugelassen (**Brune et al. 2000**).

Neben der klaren proinflammatorischen Rolle der Prostaglandine untermauerten **Gilroy et al. 1999** die Hypothese, wonach die Prostaglandine auch in der späten Phase für die Resolution der Entzündung bedeutsam sind. Sie zeigten einen zeitlichen Zusammenhang zwischen einem frühen PGE₂ Gipfel (nach 8 h) mit der Induktion der COX-2 Expression und der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Entzündungsgebiet. Nach 48 h folgte ein zweiter Prostaglandingipfel von PGD₂ und PGJ₂, begleitet von einer noch stärkeren COX-2 Induktion und einer Auflösung der Entzündung. Somit ist die Rolle der COX-2 in der Entzündungsreaktion komplexer als bisher angenommen.

Tabelle 5: Konzentration verschiedener NSAIDs, die zur Halbierung der enzymatischen Aktivität der COX-1 und COX-2 nötig sind (nach **Taketo 1998**)

NSAID	IC50 (µM) für COX-1	IC50 (µM) für COX-2
Aspirin	0,3	50
Indomethacin	0,01	0,6
Diclofenac	0,5	0,35
Celebrex (SC 58215)	10	0,05
NS 398	75	1,77

1.4 COX-2 und maligne Tumore

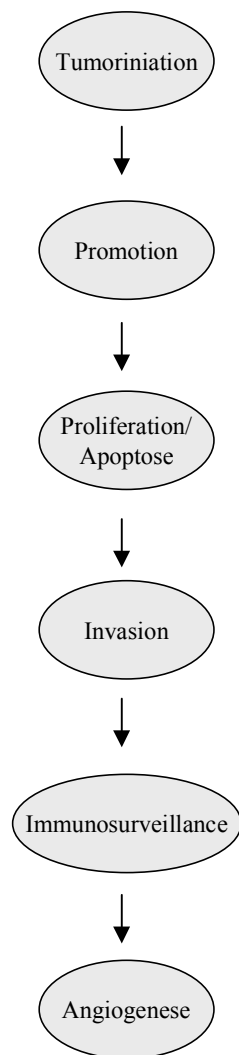
Nachdem die Risikoreduktion für kolorektale Karzinome durch die Einnahme von NSAIDs in epidemiologischen Studien beschrieben wurde, folgten eine Reihe immunhistologischer Untersuchungen zur Expression von COX-1 und COX-2 in verschiedenen Karzinomen. **Eberhart et al. 1994** beschrieben eine im Vergleich zur normalen Mukosa erhöhte Expression der COX-2 in 86% der kolorektalen Karzinome und 40% der kolorektalen Adenome. Im Gegensatz dazu wurden keine Unterschiede bezüglich der Expression der COX-1 in transformierten und normalen Kolongeweben gefunden (**Eberhart et al. 1994, Kargmann et al. 1995, Sano et al. 1995**).

Tabelle 6: Immunhistologische Untersuchungen zur Expression der COX-2 in Karzinomen

Karzinomtyp	Häufigkeit der Expression in Karzinomen	Stärke der Expression im Normalgewebe	Autor
Kolon	76% (n=25)	schwach	Kargmann et al.
	100% (n=15)	schwach	1995
			Sano et al. 1995
	90% (n=20)	n.u.	Dimberg et al. 1999
Magen	83% (n=23)	schwach	Uefuji et al. 1998
Lunge			
Adeno	90% (n=21)	n.u.	Wolff et al. 1998
Plattenepithel	100% (n=11)	n.u.	
Adeno	70% (n=59)	schwach	Hida et al. 1998
Kleinzellig	negativ		
Oesophagus			
Plattenepithel	91% (n=172)	schwach	Zimmermann et al.
			1999
Adeno	78% (n=27)	schwach	
Pankreas	90% (n=10).	negativ	Tucker et al. 1999
Kopf-und	100% (n=6)	schwach	Chan et al. 1999
Halstumoren			
Hepatozellulär	97% (n=29)	schwach	Shiota et al. 1999
(HCC)	100% (n=44)	schwach	Koga et al. 1999

Welche Schritte der Tumorigenese durch NSAIDs und neuerdings auch durch COX-2-spezifische Inhibitoren moduliert werden, ist in Abb. 4 dargestellt und wird im Folgenden detailliert besprochen.

Tumorigenese



Wirkung der NSAIDs

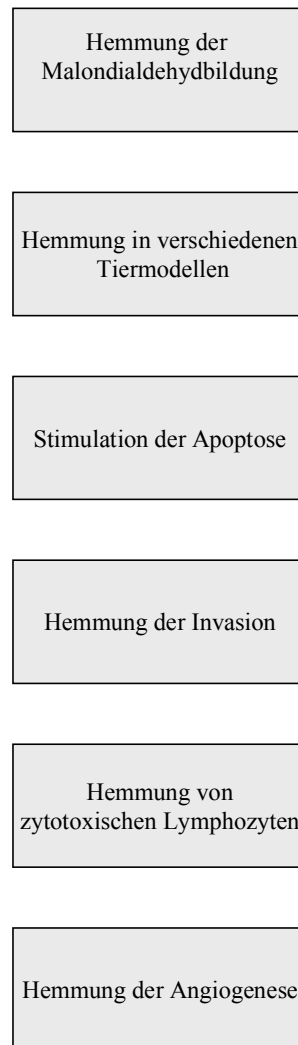


Abbildung 4: Antitumorigene Angriffspunkte der NSAIDs

1.4.1 Tumoriniation und Tumorpromotion

Aus dem Vorläuferprostaglandin PGH_2 kann enzymatisch das Mutagen Malondialdehyd (MDA) entstehen, welches an desoxygenierte Basenreste der DNA bindet. Inwiefern MDA in die Mutagenese genomischer DNA *in vivo* involviert ist, ist nicht bekannt, weswegen diese Rolle der COX-2 in der Tumoriniation hypothetisch bleibt (**Marnett 1992**).

Die Promotion epidermaler Tumoren durch Eikosanoide am Mausmodell wurde von der Arbeitsgruppe um **Furstenberger et al. 1989** gezeigt. Nach chemischer Papillominduktion verstärkte der Tumorpromoter 12-O-tetradekanoyl-phorbol-14-azetat (TPA) die Ausbildung der Hautpapillome sowie die Synthese von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$. Die lokale Gabe von Indomethacin kurz vor dem induzierten Prostaglandingipfel, welcher mit erhöhter COX-2 Expression einherging, blockierte die Papillombildung.

Weitere Argumente für die tumorpromovierende Wirkung der COX-2 lieferte ein APC-knock-out Mausmodell. Diese Mäuse entwickelten, wie Patienten mit FAP, multiple Polypen im Intestinaltrakt. Die Entstehung der Polypen konnte sowohl durch einen COX-2-spezifischen Inhibitor als auch durch die Ausschaltung des COX-2-Gens unterdrückt werden. Es zeigte sich insofern ein Gendosiseffekt, als dass COX-2-heterozygote APC-knock-out Mäuse eine mittelgradige Polypenreduktion aufwiesen (**Oshima et al. 1996**).

Diese Ergebnisse ließen sich in der MIN (Multiple intestinale Neoplasien)-Maus verifizieren. Die MIN-Maus trug eine karzinogeninduzierte nonsense-Mutation des APC-Gens und entwickelte in 100% der Fälle intestinale Polypen. Die Adenomentwicklung konnte durch Ausschaltung des COX-2-Gens um 70% reduziert werden (**Chulada et al. 2000**). Auch im karzinogeninduzierten Kolonkarzinom der Ratte konnte durch einen COX-2-spezifischen Inhibitor eine Unterdrückung der Tumorbildung um etwa 90 % erzielt werden (**Kawamori et al. 1998**).

Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für Konzepte zur Chemoprävention (**DeWitt and Smith 1995**). Erste erfolgversprechende klinische Daten mit dem NSAID Sulindac Sulfon erbrachten randomisierte plazebokontrollierte Studien bei Patienten mit FAP. Sulindac Sulfon wurde nach subtotaler Kolektomie als Sekundärprophylaxe verabreicht und verminderte signifikant die Anzahl der neugebildeten Polypen (**Nugent et al. 1993**). Neuerdings werden bei FAP auch COX-2-spezifische Inhibitoren wie Celebrex erfolgreich eingesetzt (**Steinbach et al. 2000**).

1.4.2 Tumorzellproliferation

Bei der Untersuchung der Proliferation verschiedener Karzinomzelllinien *in vitro* unter Einfluss von COX-2-spezifischen Inhibitoren ergaben sich abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Ergebnisse. (Tab.7)

Tabelle 7: Wirkung COX-2-spezifischer Inhibitoren auf das Wachstum verschiedener Karzinomzelllinien

Karzinom	Karzinom- zelllinie	COX-2- spezifischer Inhibitor	Konzen- tration	Zellwachs- tumseffekt	Autor
Kolonrektal	HCA-7	SC 58125	25 µM	-35 %	Coffey et al. 1997
	HCA-7	SC 58125	25 µM	-46 %	Chinery et al. 1999
		NS 398	50 µM	-80 %	
	HCA-7	SC 58125	25 µM	-55 %	Sheng et al. 1998
	HT-29	NS 398	82 µM	-50 %	Elder et al. 1997
	S/KS		78 µM	-50 %	
	LIM 1899	NS 398	100 µM	+/- 0	Murphy et al. 1997
	COLO205	NS 398	10µM	+/- 0	Hong et al. 1999
Oesophagus	OSC-2	NS 398	100 µM	-52 %	Zimmermann et al. 1999
Prostata	LNCaP	NS 398	5 µM	-50%	Liu et al. 1998
Mamma	SKBR3	NS 398	10 µM	+/- 0	Hong et al. 1999
	ZR75				

Sehr wahrscheinlich wird die Wachstumsreduktion bei COX-2 Inhibition nicht durch Eingriff in den Zellzyklus verursacht, sondern durch Apoptoseinduktion. Dies konnte für die kolorektale Karzinomzelllinie HCA-7 bereits gezeigt werden (**Sheng et al. 1998**). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass normale intestinale Rattenepithelzellen, welche auf extrazellulärer Matrix apoptotisch werden, nach COX-2 Transfektion dazu nicht mehr in der Lage sind, aber nach Inkubation mit dem NSAID Sulindac wieder den programmierten Zelltod einleiten (**Tsujii and DuBois 1995**).

1.4.3 Progression

Es gibt bereits Hinweise, wonach die COX-2 Expression prognostische Bedeutung hat **Sheehan et al. 1999** korrelierten die Stärke der immunhistologischen COX-2 Positivität in kolorektalen Karzinomen mit dem Lymphknotenbefall und verkürztem Überleben. Ferner steht die COX-2 Expression im Magenkarzinom mit der Lymphgefäßinvasion und dem Lymphknotenbefall in Zusammenhang (**Murata et al. 1999**). Diesen Beobachtungen griff eine *in vitro* Studie von **Tsujii et al. 1997** voraus, in welcher COX-2 transfizierte humane kolorektale Karzinomzelllinien eine 6-fache Invasivität im Matrigel-Invasionsassay zeigten. Dieser Effekt konnte durch Sulindac Sulfon gehemmt werden. Auch Indomethacin inhibierte die Invasivität von murinen Melanomzellen im Matrigel-Invasionsassay (**Reich et al. 1996**).

Prostaglandine, vor allem PGE₂, können Angiogenesefaktoren induzieren. **Tsujii et al. 1998** untersuchten in einer Kokultur von Endothelzellen und COX-2 transfizierten humanen Kolonkarzinomzellen die *in vitro* Angiogenese. Die Hemmung der COX-2 Expression oder Funktion führte zu einer verminderten Sekretion von angiogenetischen Faktoren durch die Tumorzellen, die Hemmung der COX-1 Expression unterdrückte dagegen direkt die Bildung von kapillarartigen Röhren aus Endothelzellen. **Jones et al. 1999** hingegen zeigten anhand von humanen Endothelzellen, welche in definierter Extrazellulärmatrix spontan kapillarartige Strukturen bilden, dass auch die spezifische COX-2 Hemmung mittels NS 398 (100µM) zu einer um 85% verminderten *in vitro* Angiogenese führt. **Masferrer et al. 2000** erzielten nur mit dem COX-2-spezifischen Inhibitor Celebrex, aber nicht mit einem COX-1 Inhibitor, eine Hemmung der Blutgefäßneubildung in einem Rattenmodell. Somit lassen diese Studien vermuten, dass

neben den traditionellen NSAIDs auch neuere COX-2-spezifische Inhibitoren die Angiogenese hemmen.

Mit dem Eintritt in die Blutzirkulation setzen sich Tumorzellen in besonderem Maße der Immunosurveillance des Tumorträgers aus. Die Tumorzellen selber oder von ihnen aktivierte Makrophagen können PGE_2 sezernieren, welches die Teilung von zytotoxischen T-Lymphozyten und die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen unterdrückt (**Hwang et al. 1998**). Die Bildung von gemischten Plättchen-Tumor-Aggregaten scheint das Überleben der neoplastischen Zellen sowie die Filterung im Kapillarbett und damit die Möglichkeit zur Adhäsion zu begünstigen. Unter experimentellen Bedingungen ließ sich eine geringere Metastasierung durch NSAIDs unter Verschiebung des Verhältnisses von TBA_2 zu PGI_2 erreichen (**Honn et al. 1992**), was hieße, dass eine antithrombotische Therapie die Metastasierungsrate vermindern könnte.

Xenograft-Metastasierungsstudien in immuninkompetenten Mäusen bestätigten die o.g. Ergebnisse. Die mit COX-2-spezifischen Inhibitoren behandelten Tiere wiesen eine reduzierte Anzahl und Größe von Metastasen der implantierten kolorektalen Karzinomzellen auf (**Sheng et al. 1997, Chinery et al. 1999**).

1.4.4 molekularer Mechanismus

Klassischerweise hemmen NSAIDs die COX und damit die Synthese von Prostaglandinen.

Einerseits könnte nun die verminderte Bindung von PG an ihre Membranrezeptoren oder ihre nukleären Rezeptoren die o.g. Wirkungen vermitteln. Andererseits gibt es in letzter Zeit Untersuchungen wonach NSAIDs neben der COX andere zelluläre Substrate, sog. non-COX-Targets, besitzen.

1.4.4.1 Interaktion mit membranären Prostaglandinrezeptoren

Welche Prostaglandine könnten tumorigen über Membranrezeptoren wirken? PGA_2 und PGD_2 wurde frühzeitig eine antitumorigene Aktivität zugeschrieben, indem gezeigt wurde, dass sie das Wachstum von Melanomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmten (**Stringfellow and Fitzpatrick 1979, Bregmann et al. 1986**). TXA_2 und PGI_2 haben eine spezielle Funktion im Gerinnungssystem. So konzentrierte sich das Interesse auf PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$, welche beide von

Tumorzellen gebildet werden (**Hubbard et al. 1988**). Kolonkarzinomgewebe enthielt mehr PGE₂ als die umgebene normale Mukosa (**Maxwell et al. 1990, Rigas et al. 1993**). **Narisawa et al. 1990** konnten eine Korrelation zwischen dem venösen Plasmaspiegel von PGE₂ und dem Ausmaß der Metastasierung in kolorektalen Karzinomen belegen.

Direkte Hinweise auf eine prostaglandin-vermittelte Wirkung geben die in Tab.8 aufgeführten Untersuchungen, wo der durch COX-Hemmung erzielte Effekt durch die exogene Gabe von Prostaglandinen wieder aufgehoben werden konnte. Zusätzliche Indizien für PGE₂ lieferten **Tsujii et al. 1997** in HCA-7 Zellen, indem sie eine Korrelation zwischen der COX-2-Biosynthesehemmung und der *in vitro* Invasionshemmung durch NS 398 herstellten.

Tabelle 8: Effekte exogen substituierter Prostaglandine bei verschiedenen Tumoren

Autor	exogene Prostaglandine	Wirkung
Furstenberger et al. 1989	PGF _{2α}	stellte die durch Indomethacin gehemmte Hautpapillombildung der Maus wieder her.
Young et al. 1990	PGE ₂	steigerte die <i>in vitro</i> Migration und die <i>in vivo</i> Metastasierung von Lewis Lungenkarzinomzellen in der immuninkompetenten Maus.
Reich et al. 1996	PGF _{2α}	stellte die durch Indomethacin gehemmte <i>in vitro</i> Invasion von murinen Melanomzellen wieder her.
Sheng et al. 1998	PGE ₂	hob die durch NS 398 erzielte Apoptosesteigerung in HCA-7 Zellen wieder auf.
Inaba et al. 1999	PGE ₂	stellte die durch Indomethacin gehemmte Kolonkarzinom-induktion in Ratten wieder her.
Jones et al. 1999	PGE ₂	stellte die durch NS 398 gehemmte <i>in vitro</i> Angiogenese durch Endothelzellen wieder her.

1.4.4.2 Interaktion mit nukleären Prostaglandinrezeptoren

Yu et al. 1995 beschrieben Prostaglandine als PPAR-Liganden, wobei als wichtigste Vertreter PGI₂ und PGJ₂ in Frage kommen (siehe auch Tab. 2).

COX-2 defiziente Mäuse zeigten eine reduzierte Embryoimplantation, welche durch exogenes PGI₂ wieder aufgehoben werden konnte. Dieser Effekt wird nicht durch einen membranären IP-Rezeptor, sondern durch PPAR δ vermittelt (**Lim et al. 1999**). Ausgehend von dieser Beobachtung zeigten Gupta et al. 2000, dass PGI₂ auch in Kolonkarzinomzellen PPAR δ aktivieren kann. Darüber hinaus war die Expression von PPAR δ in Kolonkarzinomen im Vergleich zu normaler Mukosa erhöht. PPAR δ wies eine ähnliche Verteilung wie die COX-2 auf. **Chinery et al. 1999** demonstrierten, dass der PPAR γ -Ligand PGJ₂ die durch COX-2-Antisense-Oligonukleotide gehemmte Proliferation von HCA-7 Zellen wieder herstellte.

Interessanter Weise besitzen die beiden COX-Isoformen eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation. Die COX-1 ist zytosolisch lokalisiert und könnte eher PG für die Membranrezeptoren generieren. Dagegen liegt die COX-2 perinukleär, und die synthetisierten PG könnten als PPAR-Liganden fungieren (**Morita et al. 1995**).

1.4.4.3 Prostaglandin-unabhängiger Mechanismus

Andererseits gibt es Studien, die einen prostaglandin-unabhängigen Signalweg favorisieren. Sulindac Sulfon, ein Sulindac-Metabolit ohne direkte COX-hemmende Aktivität, bewirkte ebenso wie Sulindac eine Verminderung des Kolontumorwachstums *in vitro* und *in vivo* (**Piazza et al. 1995, Piazza et al. 1997, Reddy et al. 2000**). Umgekehrt konnte in vollständig COX-2-defizienten Karzinomzelllinien, in gleicher Weise wie in COX-2-exprimierenden Zelllinien, mittels NSAIDs Apoptose induziert werden (**Elder et al. 1997**). In gleicher Weise blieben COX-1- und COX-2-null Mäusefibroblasten hinsichtlich der antiproliferativen Wirkung von NSAIDs sensibel (**Zhang et al. 1999**). Die in COX-2-positiven Kolonkarzinomzelllinien produzierten

Prostaglandine konnten bei exogener Substitution die Proliferationshemmung durch NSAIDs nicht aufheben (**Hanif et al. 1996**, **Coffey et al. 1997**). Weiterhin waren die Konzentrationen der COX-2-spezifischen Inhibitoren, welche benötigt wurden um zelluläre Effekte wie Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion zu erzielen, 10- bis 100-mal so groß wie die IC₅₀ der Prostaglandinsynthesehemmung, was eine zusätzliche zelluläre Wirkung vermuten lässt (siehe Tab. 5 und 7).

1.4.4.4 Non-COX-Target

Neben den beiden Isoformen der COX wurden für traditionelle NSAIDs weitere zelluläre Substrate beschrieben (Abb. 5).

Kopp and Ghosh 1994 demonstrierten eine inhibitorische Wirkung von Aspirin auf den Transkriptionsfaktor NF-kappaB. **Lehmann et al. 1997** zeigten, dass die NSAIDs Ibuprofen und Indomethacin als Liganden PPAR α und PPAR γ aktivieren.

Kürzlich beschrieben **He et al. 1999**, dass dagegen der dritte Isotyp der PPARs, PPAR δ durch NSAIDs gehemmt wird. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das NSAID Sulindac seine apoptotische Wirkung über PPAR δ vermittelt. 1) Sulindac-induzierte Apoptose wurde durch die Überexpression von PPAR δ gehemmt. 2) Sulindac bindet direkt an PPAR δ und vermindert dessen Affinität zu spezifischen DNA Response-Elementen.

Interessanter Weise ergibt sich auch ein crossover mit dem β -Catenin/Tcf Signalweg. In Kolonkarzinomen kommen inaktivierende Mutationen des APC-Gens während der Tumori- niation vor. Inaktives APC ist nicht mehr in der Lage β -Catenin zu degradieren. β -Catenin, welches normalerweise mit der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin interagiert, akkumuliert im Zytoplasma. Als Kofaktor bindet das vermehrte β -Catenin den Transkriptionsfaktor Tcf (T Zell Faktor). Dieser β -Catenin/Tcf Komplex induziert die Expression von verschiedenen Onkogenen wie c-myc, Zyklin D1 und Matrilysin aber auch von PPAR δ .

Zusammenfassend könnte sich hier zumindest für das kolorektale Karzinom ein Modell eröffnen, wo genetische Veränderungen wie die APC Mutation durch pharmakologische Wirkungen der

NSAIDs kompensiert werden. Theoretisch könnte eine APC oder β -Catenin Mutation, die zu einer erhöhten PPAR δ -Aktivität führt, durch NSAIDs wieder supprimiert werden.

Wie in Abschnitt 1.4.4.2. erwähnt, gibt es bereits Untersuchungen zur Expression von PPAR δ in Kolonkarzinomen. PPAR δ war im Kolonkarzinom im Vergleich zu normaler Mukosa erhöht und wies eine ähnliche Verteilung wie die COX-2 auf (**Gupta et al. 2000**).

Dass auch COX-2-spezifische Inhibitoren wie NS 398 Non-Cox-Targets besitzen, zeigten **Zhang and DuBois 2000**. Mittels differentieller Genexpressionsanalyse wurden HCA-7 Zellen mit und ohne Behandlung mit NS 398 (bis 100 μ M) untersucht. Das proapoptotische Gen Par-4 zeigte eine erhöhte Expression nach NS 398 Behandlung. Somit könnte Par-4 einen Mediator für die apoptotische Wirkung der NSAIDs darstellen.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass mit heutigem Wissensstand eine konträre Datenlage zur Bedeutung der Prostaglandine als Mediatoren der COX-2-vermittelten Tumorchemmung vorliegt. Möglicherweise sind prostaglandin-abhängige und -unabhängige Pfade involviert.

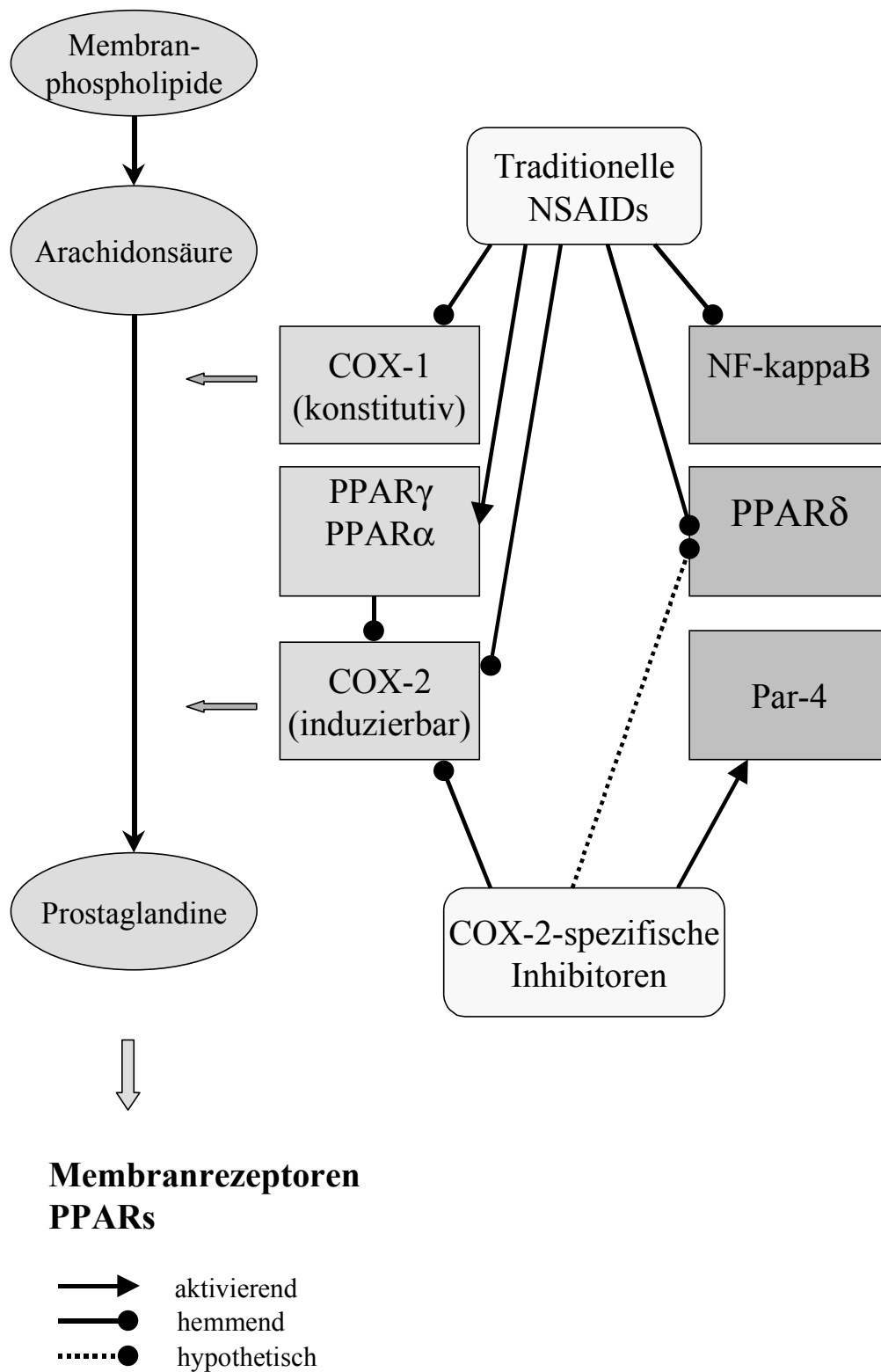


Abbildung 5: Molekulare Targets der NSAIDs

1.5 Malignes Melanom

In dieser Studie sollten die Expression und Funktion der COX-2 in malignen Melanomen als Vertreter nichtepithelialer Tumoren untersucht werden. Die Inzidenz maligner Melanome hat in den letzten Jahren ständig zugenommen. Risikofaktoren für deren Entstehung sind neben der Intensität der Sonnenexposition die Anzahl der melanozytären Naevuszell-Naevi, mehr als drei dysplastische Naevi, mehr als drei schwere Sonnenbrände in der Anamnese sowie Lentigo simplex. Die Mortalitätsrate stieg langsamer als die Inzidenzrate an, was auf frühere Diagnose und Exzision zurückzuführen ist (**MaKie 1998**). Die Prognose wird durch das Auftreten von Lymphknoten- oder Fernmetastasen bestimmt. Zur Abschätzung des Metastasierungsrisikos werden die Eindringtiefe in die Haut (**Clark et al. 1989**) und die Tumordicke (**Breslow 1975**) bestimmt. Zwei Wachstumsformen werden unterschieden. Das maligne Melanom kann nach oberflächlicher Ausbreitung in die vertikale Wachstumsphase übergehen und mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in Gefäße einbrechen, sowie Tochtergeschwülste bilden. Melanomzellen müssen auf dem Weg aus ihrem primären Tumorverband die Basalmembran des Epithels (Infiltration) und eines Gefäßes (Invasion) durchdringen, um lymphogene oder hämatogene Tumorabsiedelungen (Metastasen) zu setzen. Diese Basalmembranen stellen aufgrund ihrer dichten Matrix, vorwiegend aus Kollagen IV und Laminin, das größte Hindernis für die Tumorzellen dar und sollten mit dem unten beschriebenen Matrigel-Invasionsassay *in vitro* simuliert werden.

Erste Hinweise, dass die COX auch in die Tumorigenese des malignen Melanoms involviert sein könnte, stammen aus der bereits oben zitierten Arbeit von **Reich et al. 1996**. Das konventionelle NSAID Indomethacin hemmte die *in vitro* Invasion von murinen Melanomzellen.

Da maligne Melanome strahlen- und chemotherapierefraktär sind, sind die therapeutischen Optionen in fortgeschrittenen Stadien eingeschränkt. Somit kommt einer erfolgversprechenden adjuvanten Therapie eine große Bedeutung zu. Einen Angriffspunkt könnte die COX-2 bieten.

2 Zielstellung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der COX-2 für Proliferation und Invasion an einem breiten Spektrum der malignen Melanomzelllinien (MeWo, SK Mel 13, SK Mel 28, A 375, IGR 37, C 8161) *in vitro* zu untersuchen.

Die folgenden Fragen sollten geklärt werden:

- Wird COX-2-Protein von den o.g. malignen Melanomzelllinien exprimiert?
- Ist das gebildete Enzym des Arachidonsäurestoffwechsels funktionsfähig und bildet es Prostaglandin E₂ unter Basalbedingungen und nach Substratzusatz?
- Wird die enzymatische Funktion der COX-2 durch den spezifischen Inhibitor NS 398 gehemmt?
- Wie groß ist die IC₅₀ von NS 398 für die Prostaglandinsynthesehemmung?
- Beeinflusst NS 398 die Proliferation von malignen Melanomzellen *in vitro*?
- Beeinflusst NS 398 die Invasion von malignen Melanomzellen *in vitro*?
- Können diese Effekte durch exogene Substitution von Prostaglandin E₂ wieder aufgehoben werden?
- Beeinflusst NS 398 die Wirkung der von diesen Melanomzelllinien gebildeten Gelatinasen?

3 Material und Methoden

3.1 Antikörper, Chemikalien und Kits

Antimäus-IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase	Tropix, Bedford, USA
Arachidonsäure	Sigma, Deisenhofen, D
BCA Protein Assay Kit	Pierce Rockfort, UK
CDP-Star	Tropix, Bedford, USA
monoklonaler COX-1 Antikörper	Cayman, Ann Arbor, USA
monoklonaler COX-2 Antikörper	Transduction Laboratories, Lexington, USA
DMEM	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, D
DMSO	Sigma, Deisenhofen, D
Fötale Kälberserum	PAA Laboratories, Linz, Au
High range Molekulargewichtsmarker	Sigma, Deisenhofen, D
I-Block	Tropix, Bedford, USA
Matrigel	Becton Dickinson, Heidelberg, D
MTT-Reagenz	Sigma, Deisenhofen, D
NS 398	Alexis, Grünberg, D
Prostaglandin E ₂	Sigma, Deisenhofen, D
PGE ₂ -ELISA	R&D Systems, Wiesbaden, D
Trypsin/ EDTA-Lösung	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, D
XTT-Reagenz	Boehringer, Mannheim, D
weitere Chemikalien	Sigma, Deisenhofen, D

3.2 Instrumente und Verbrauchsmaterial

CASY-Cell Counter	Schärfe Systems, Reutlingen, D
Densitometer G760	Bio Rad, Richmond, USA
ELISA-Reader	Bio-Tek Instruments, Winooski, USA
Hyperfilm	Amersham, Braunschweig, D
Kulturplatten 12 bzw. 96 well	Falcon/ Becton Dickinson, Heidelberg, D
Molecular Analyst Software	Biorad, Richmond, USA
Potran-Membran	Schleicher und Schwell, Dassel, D
Transwellmembraneinsätze, Porengröße 8µm	Corning Costar, Cambridge, USA

3.3 Gele, Puffer und Lösungen

Blocking-Puffer	0,2% I-Block 1x PBS 0,1% Tween-20
Coomassie-Färbelösung	0,6% Coomassie-Blau, G250 10% Essigsäure
Färbe-Fixierlösung für Comassie	25% Isopropanol 10% Essigsäure
Gelatinegel	10% Gelatine 2,25 ml Acrylamid 3 ml Gelpuffer (0,4% SDS, 1,5 M TRIS-HCl 8,8) 120 µl APS 10% 12 µl TEMED 6,75 µl H ₂ O
Polyacrylamidgel 10%	25% Acrylamid 0,375 M TRIS-HCl (pH 8,8) 0,1% SDS 0,05% APS

	0,005% TEMED
Proteinlysispuffer	62,5 mM TRIS-HCl (pH 6,8)
	2% SDS
	10% Glycerol
	50 mM DTT
	0,1% Bromphenolblau
Kollagenasepuffer	150 mM NaCl
	10 mM CaCl ₂
	0,05 % NaN ₃
	50 mM Tris-HCl
Proteinladungspuffer 4x	1,25 ml TRIS-HCl 0,5 M
	2,5 ml Glycerol
	5 ml 20% SDS
	1,25 ml 1% Bromphenolblau
	+1/5 β-Mercaptoethanol
SDS 2x	250 mM TRIS-HCl
	4% SDS
	10% Glycerol
Standardkulturmedium DMEM	10% FKS
	2% Glutamin
Transferpuffer, pH 8,3	2,9g Glycin
	5,8g TRIS-Base
	0,37g SDS
	200 ml Methanol auf 8000 ml Aqua bidest
TRIS-Puffer 10x, pH 7,4	9g TRIS-Base
	68,5g TRIS-HCl
	87,8g NaCl auf 1000 ml Aqua bidest
Waschpuffer Western Blot	1% PBS
	0,1% Tween-20

3.4 Zelllinien und Zellkultur

Die humanen Melanomzelllinien A 375 (Giard et al. 1973), C 8161 (Bregmann et al. 1986), IGR 37 (Weinreb and Travo 1984), MeWo, SK Mel 13 und SK Mel 28 (Fogh et al. 1977) wurden von der American Tissue Culture (ATCC) bezogen und sind umfangreich charakterisiert (Welch et al. 1991, Eberle et al. 1993). Die Zellen wuchsen unter sterilen Bedingungen bei 37°C in einer H₂O-gesättigten, 5%igen CO₂-Atmosphäre. Die Zelllinien wurden in DMEM-Medium, supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum und 2% L-Glutamin, über maximal 10 Passagen kultiviert.

3.5 Western Blot

Die subkonfluenten Zelllinien lysierte man auf Eis in einer 40 mm Petrischale mit 100µl Proteinlysispuffer. Das Lysat wurde mittels einer Insulinspritze mehrmalig mechanisch degradiert und bei –20°C gelagert. Die Proteinkonzentrationen konnten mit dem BCA Protein Assay Kit nach Anleitung des Herstellers bestimmt werden. Die Proteinproben (100µg) wurden mit 2x SDS auf 10 µl aufgefüllt und mit dem dritten Teil Proteinladungspuffer versetzt und der heißen Lyse bei 95 °C für 10 Minuten unterzogen. Es folgte die Auftrennung der Proben in einem 10%igen Polyacrylamidgel mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese bei 90 V für 2 Stunden. Danach blottete man die Proteine in einem Semi-Dry-System bei 100mA für 90 min auf eine Nitrozellulosemembran. Die Inkubation über Nacht in Blocking-Puffer bei 4°C blockierte unspezifische Bindungsstellen. Die monoklonalen Primärantikörper wurden, jeweils 1:250 verdünnt, in Blocking-Puffer für eine Stunde auf die Membran gegeben. Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem sekundären goat-anti-mouse Antikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, in einer Verdünnung von 1:5000 in Blocking-Puffer für 45 min. Nach nochmaligem Waschen reagierten die Banden für 5 min mit dem CDP-Star RTU Lumineszenzsystem und belichteten einen Hyperfilm.

3.6 PGE₂-ELISA

Konfluente Zellen säte man nach Trypsinierung und Zentrifugation (1100 U/min, 10 min) in mehrere 12-well-Kulturschalen in einer Dichte von 50.000 Zellen /500 µl in serumhaltigem Medium aus. Es folgte die Inkubation mit und ohne NS 398 (50 µM) und für die MeWo-Zelllinie in einer Konzentrationsreihe für NS 398 von 0,1 bis 50 µM. Nach 24 h wurde das Medium durch identisches Volumen mit und ohne das Substrat Arachidonsäure (20 µM) erneuert. Nach 1 h zentrifugierte man den Überstand (5000 U/min, 10 min) und blockierte die Cyxlooxygenase durch 10 µg/ ml Indomethacin. Es folgte die Lagerung der Aliquots bei -80° C. Die Kulturschalen wurden mit 250 µl Trypsin behandelt und die Zellzahl im CASY-Cell Counter bestimmt.

Die Konzentration von PGE₂ in den Überständen konnte mittels eines spezifischen ELISAs nach Anleitung des Herstellers bestimmt werden. Die Extinktion war im ELISA-Reader bei 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 590 nm messbar. Die Konzentration von PGE₂ wurde anhand von korrespondierenden Absorptionen der kalkulierten Standardkurve berechnet. Die Sensitivität des Tests lag bei 36 pg/ml. Die Ergebnisse sind in pg/ml bezogen auf 10⁵ Zellen dargestellt.

3.7 Proliferationsassay

Die Zellen wurden in gleicher Konzentration (20.000 Zellen/ ml) in eine 96-well-Kulturschale ausgesät und wuchsen in Standardmedium. NS 398 wurde als Stammlösung in 100 mM DMSO gelöst. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel DMSO in entsprechenden Konzentrationen. Verschiedenen wells gab man NS 398 in verschiedenen Konzentrationen von 0,01 µM bis 100 µM. In gleicher Weise wurde eine Konzentrationsreihe für PGE₂ von 0,01 nM bis 1 µM angefertigt. Nach 72 h erfolgte die Zugabe des XTT-Reagenzes und nach 4 Stunden Reaktionszeit schloss sich die Messung bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm im ELISA-Reader an.

3.8 Matrigel-Invasionsassay

Transwelleinsätze mit Polykarbonatmembranen (Porengröße 8 μm) in 6-well-Kulturplatten wurden mit verdünntem Matrigel (1mg/ml in serumfreiem DMEM) in einer Konzentration von 675 μl / 4,7 cm^2 unter strengem Arbeiten auf Eis beschichtet und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Membranen mit serumfreiem DMEM folgte das Absaugen des nichtpolymerisierten Matrigels. Die Zellen säte man im oberen Kompartiment in einer Dichte von $2 \times 10^5/\text{ml}$ in serumfreiem Zellkulturmedium aus. NS 398 (50 μM) oder die Kontrolle DMSO (0,05 %) gab man in das obere und untere Kompartiment. In einigen Versuchen erfolgte eine Stunde nach Zugabe von NS 398 die zusätzliche Gabe von PGE₂ (0,05 - 100 nM). PGE₂ wurde auf Grund von Messungen von **Durant et al. 1988**, wonach die Halbwertszeit von PGE₂ in vitro 24 h beträgt, täglich supplementiert. Nach 72 h schloss sich die Inkubation der Kulturen mit 0,5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) für 4 h an (**Imamura et al. 1994**). Danach wurden die Zellen auf der Unterseite des Transwellfilters mit einem Zellscraper vorsichtig mechanisch abgewischt und in 200 μl DMSO gelöst. Separat erfolgte die Lösung der nichtinvierten Zellen im oberen Kompartiment in 200 μl DMSO und nach 1:10 Verdünnung der Zellen aus dem oberen Kompartiment wurden die Proben in eine 96-well-Kulturplatte überführt.

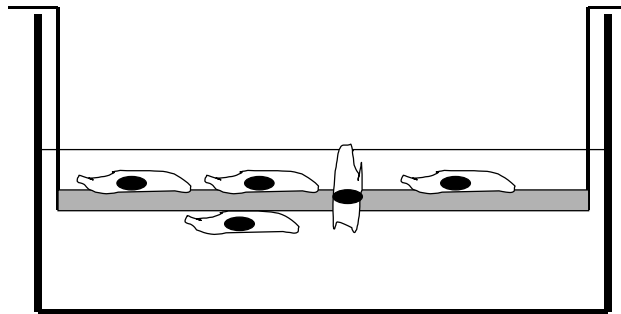


Abbildung 6: Matrigel-Invasionsassay: Transwellmembraneinsätze wurden mit Matrigel (grau) beschichtet und die Tumorzellen in das obere Kompartiment ausgesät. Nach 72 h erfolgte die Quantifizierung der Zellen an der Unterseite der Membran

Die Extinktion war am ELISA-Reader bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm messbar. Um einen Effekt des NS 398 auf den MTT-Metabolismus auszuschließen, wurde in einigen Fällen NS 398 direkt vor dem MTT dazugegeben. Die Hemmung der Invasion drückte man in Prozent zur Kontrolle aus.

3.9 Zymogramm

Die Überstände des Invasionsassays wurden bei -20° C gelagert. 20 µl Probe konnten in einer Gelatinegelelektrophorese bei 150 V in 2,5 h getrennt werden. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde das Gel in Kollagenasepuffer über Nacht inkubiert. Es folgt die Färbung mit Coomassie-Färbelösung über eine Stunde. Unter Entfärbelösung zeigten sich die Banden. Das Gel wurde am Densitometer eingescannt und mittels Molecular Analyst Software analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 COX-Protein Expression

Die sechs untersuchten Melanomzelllinien exprimierten konstitutiv COX-2 in ähnlicher Menge (Abb. 7, untere Reihe). Die Höhe der Banden lag im Bereich des Molekulargewichtsmarkers von 70 kDa und entsprach damit der Proteingröße der COX-2. Die Expression der COX-1 war in allen sechs Zelllinien vergleichsweise gering (Abb. 7, obere Reihe).

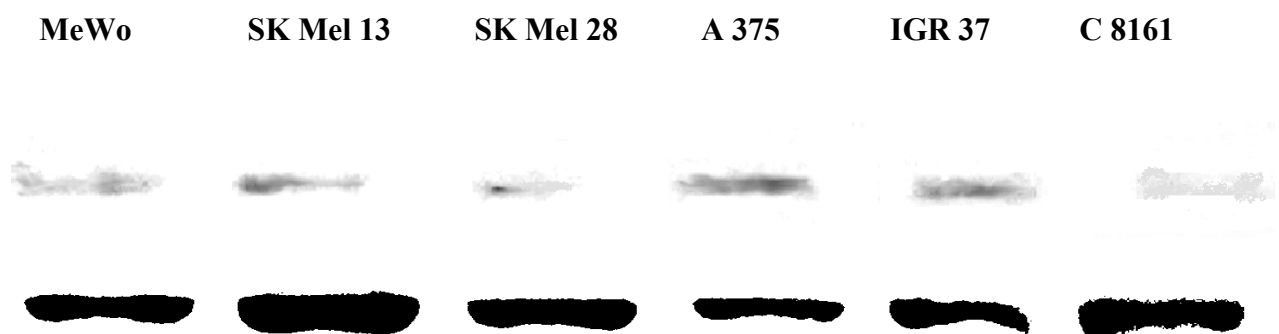


Abbildung 7: Western blot COX-1 (oben) und COX-2 (unten) von sechs Melanomzelllinien

4.2 Prostaglandin E₂-Biosynthese

Mittels eines spezifischen PGE₂-ELISAs konnte im Überstand aller sechs Melanomzelllinien basale Prostaglandin E₂-Konzentrationen von 60 bis 700 pg /10⁵ Zellen gemessen werden (Abb. 8). Nach Zugabe des Substrats Arachidonsäure (20μM) erhöhten sich die Werte auf 111 ± 25 pg /10⁵ Zellen für die Zelllinie C 8161 und 3752 ± 216 pg /10⁵ Zellen für die Zelllinie A 375. Der COX-2-spezifische Inhibitor NS 398 (50μM) inhibierte die PGE₂ Produktion der Zellen bis zu einem Restwert von etwa 100 pg/10⁵ Zellen, mit Ausnahme der Zelllinie SK Mel 28, in welcher die Inhibition nicht so hoch ausfiel.

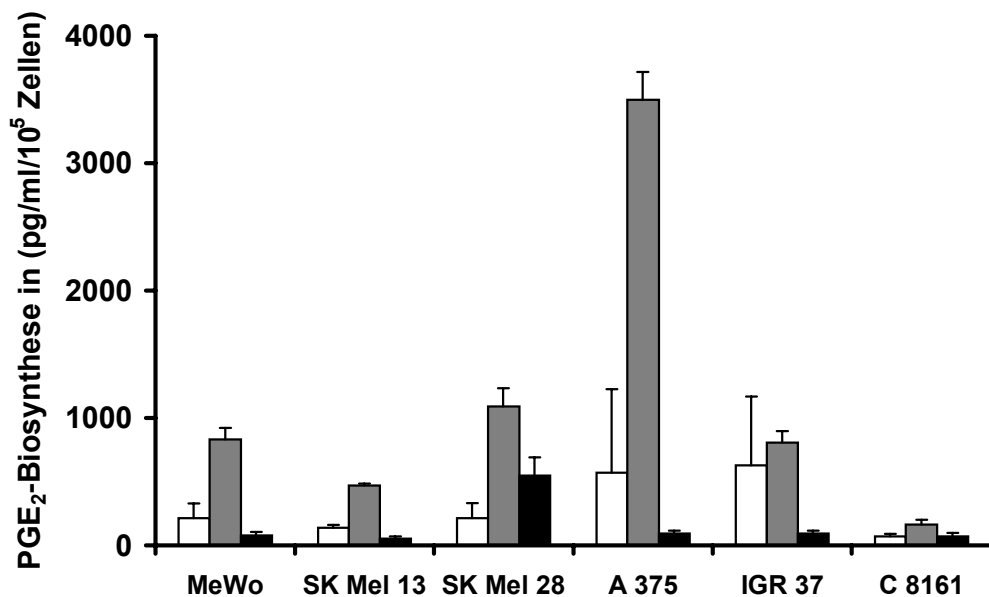


Abbildung 8: PGE₂-Biosynthese ohne (schwarz) und mit (grau) Zugabe von Arachidonsäure (20μM) als Substrat und Hemmung der faszilierten Biosynthese durch NS 398 (weiß).

In drei Zelllinien (MeWo, SK Mel 13 und IGR 37) wurde die PGE₂-Synthese bis auf ein Restwert von etwa 20 % des Ausgangswertes vermindert (Abb. 9). Bei der Zelllinie A 375 wurde die PGE₂-Produktion sogar um 96% gehemmt. Die Zelllinien SK Mel 28 und C 8161 ließen sich nur zu etwa 50 % inhibieren

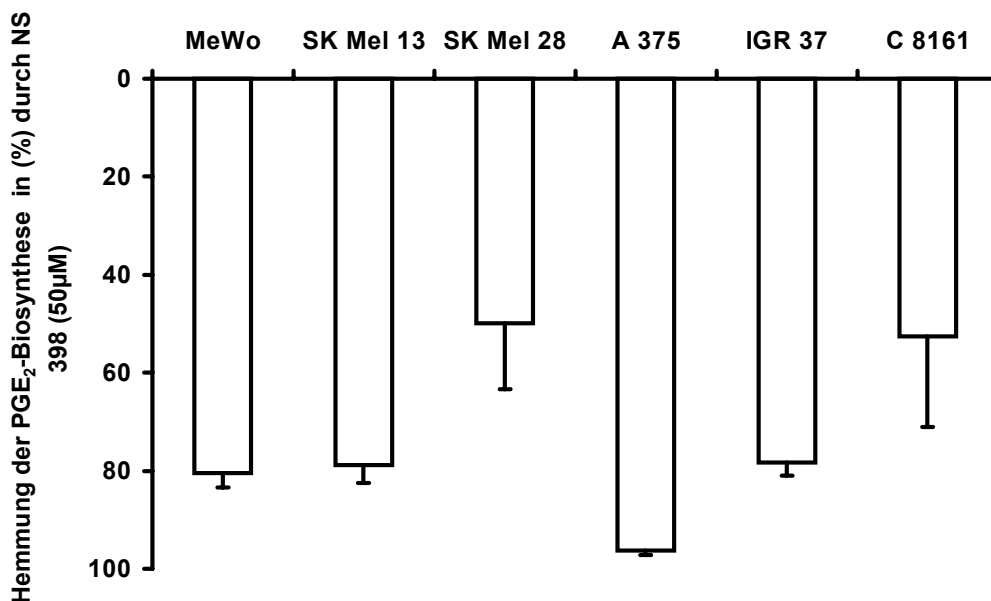


Abbildung 9: Prozentuale Hemmung der PGE₂-Biosynthese durch NS 398 (50μM).

Um die IC_{50} für die Inhibition der PG_2 -Biosynthese von NS 398 abzuschätzen, wurden MeWo Zellen mit Konzentrationen von 0,1 bis 50 μM (NS 398) inkubiert und die PGE_2 -Produktion nach Substratzugabe (20 μM Arachidonsäure) gemessen. Es ergab sich eine dosisabhängige Reduktion der PGE_2 -Produktion mit einer geschätzten IC_{50} von 6 μM . (Abb. 10)

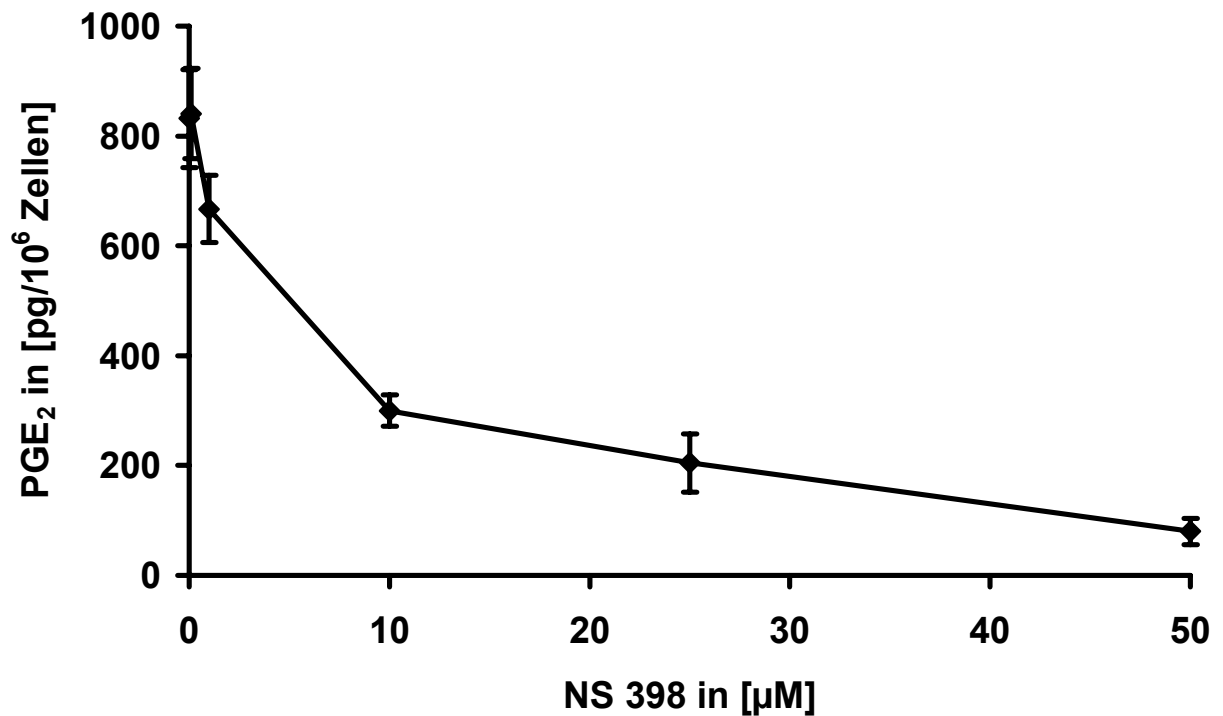


Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Hemmung der PGE_2 -biosynthese durch NS 398 (0,1 μM bis 50 μM) in MeWo Zellen.

4.3 Inhibition der Matrigel-Invasion durch NS 398

Die *in vitro* Invasivität der Melanomzelllinien wurde mit einem Matrigel-Invasionsassay mit und ohne Zugabe von NS 398 untersucht. NS 398 (50 μ M) unterdrückte die *in vitro* Invasivität der Zelllinien um Werte zwischen 46 % bei MeWo und 86 % bei C 8161 im Vergleich zur Kontrolle. Die Kontrolle wurde mit der entsprechenden Konzentration DMSO, dem Lösungsmittel von NS 398, inkubiert (Abb. 11).

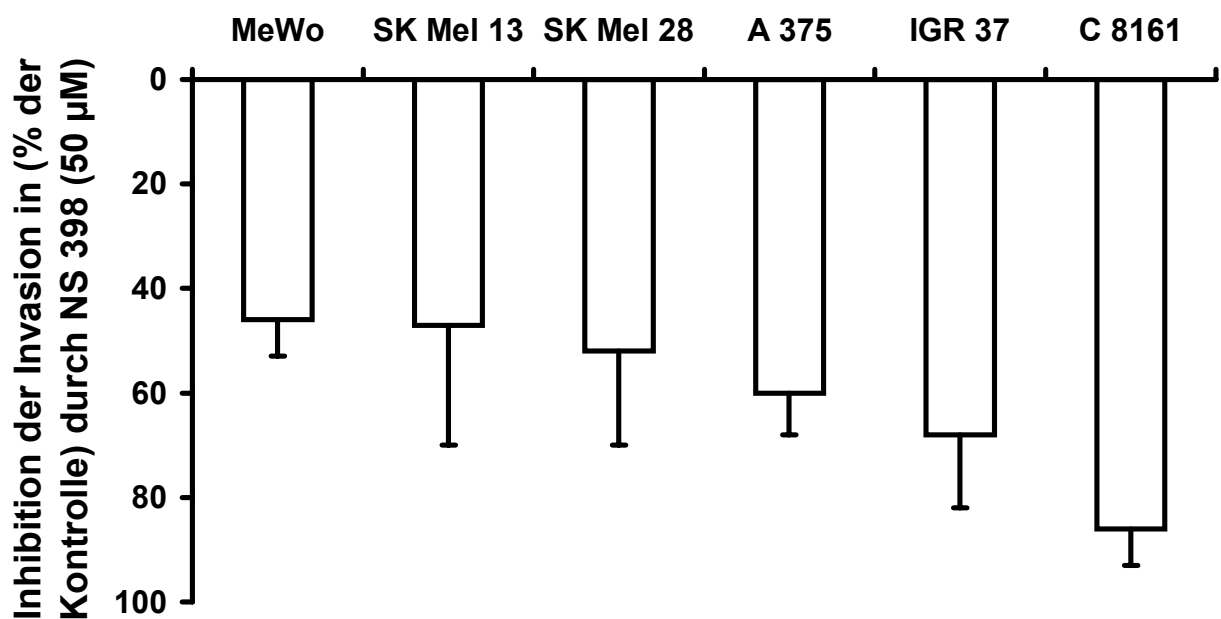


Abbildung 11: Relative Hemmung der Invasion von Melanomzelllinien durch NS 398 (50 μ M) im Vergleich zu Kontrollen in DMSO (0,05%). Dieser Effekt wurde in drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

Um zu ermitteln, ob die Invasionshemmung durch ein Produkt der COX-2 vermittelt wird, wurde zusätzlich zu NS 398 Prostaglandin E₂ (100 nM) täglich supplementiert. Die tägliche Gabe wurde aufgrund von Beobachtungen gewählt, wonach die Halbwertszeit von Prostaglandinen *in vitro* im Bereich von 20 Stunden liegt (**Durant et al. 1988**). Die Hemmung der Invasivität konnte durch PGE₂-Zusatz nicht aufgehoben werden. (Abb. 12)

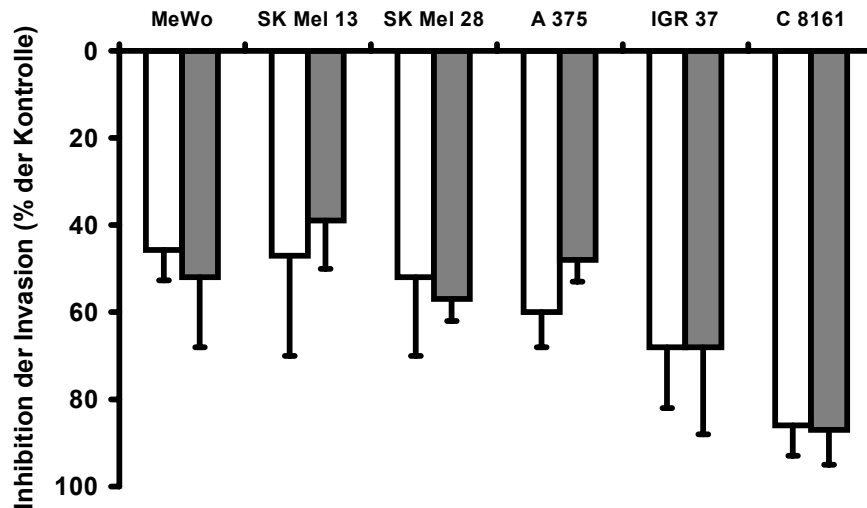


Abbildung 12: Relative Hemmung der Invasion durch NS 398 (weiß, s. Abb.11) und zusätzliche Supplementierung von PGE₂ (grau, 100nM). Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

Für die Melanomzelllinie MeWo wurde dieser mögliche Mechanismus mit einer Konzentrationsreihe von PGE₂ (0,05 nM bis 100 nM) in drei unabhängigen Experimenten detaillierter untersucht. Hierbei stellte PGE₂ die Invasivität der Zelllinie nicht wieder her (Abb. 13).

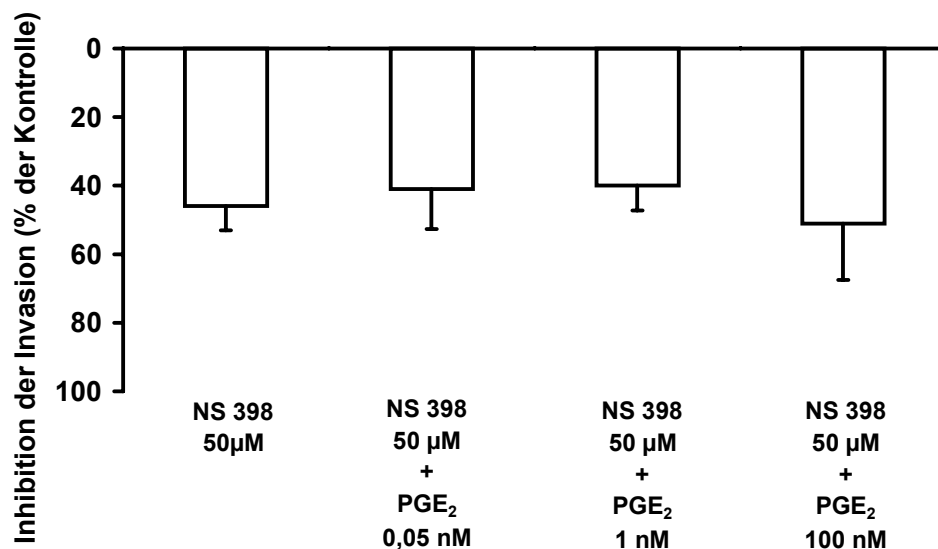


Abbildung 13: Relative Hemmung der Invasion durch NS 398 (50μM) und Supplementierung mit drei verschiedenen PGE₂-Konzentrationen. Ergebnisse aus die unabhängigen Experimenten.

4.4 Korrelationen zwischen NS 398 Einfluss auf Invasivität und PGE₂-Produktion

Um einen Zusammenhang zwischen Invasionshemmung und der Inhibition der PGE₂-Biosynthese abzuleiten, wurden beide Parameter für die einzelnen Zelllinien miteinander verglichen:

Tabelle 9: Vergleich der Invasionshemmung mit der PGE₂-Synthesehemmung

Melanomzelllinie	Invasionshemmung in %	Hemmung der PGE ₂ -Produktion in %
MeWo	46	80
SK Mel 13	47	78
SK Mel 28	52	50
A 375	60	96
IGR 37	68	79
C 8161	86	53

Um einen Zusammenhang zwischen der Hemmung der PGE₂-Produktion und der Hemmung der Invasivität herzuleiten wurden beide Größen gegeneinander aufgetragen (Abb. 14). Es zeigte sich keine Korrelation beider Größen. Bei C 8161 wurde die Invasivität um 86 % gehemmt, die Prostaglandinsynthese hingegen nur zu etwa 50 % bei einer relativ geringen Absolutsynthese von PGE₂. A 375 liegt mit 60 % Invasionshemmung im mittleren Bereich der untersuchten Zelllinien, zeigt aber die deutlichste Hemmung der PGE₂ Biosynthese mit 96%.

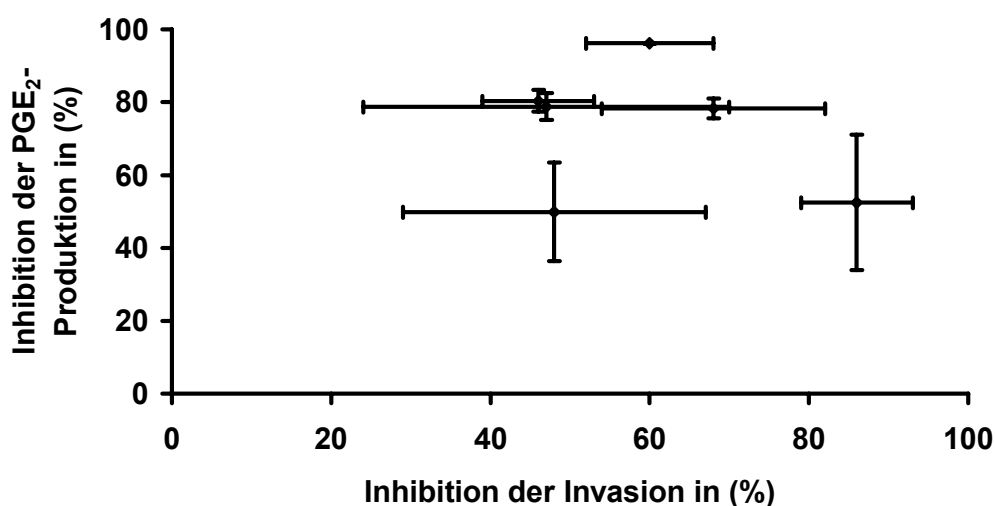
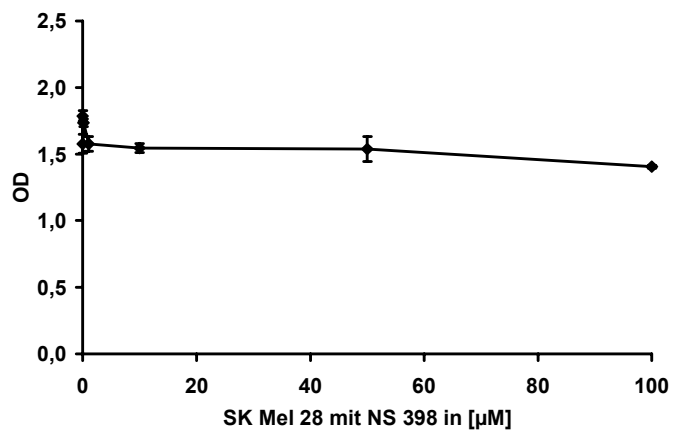
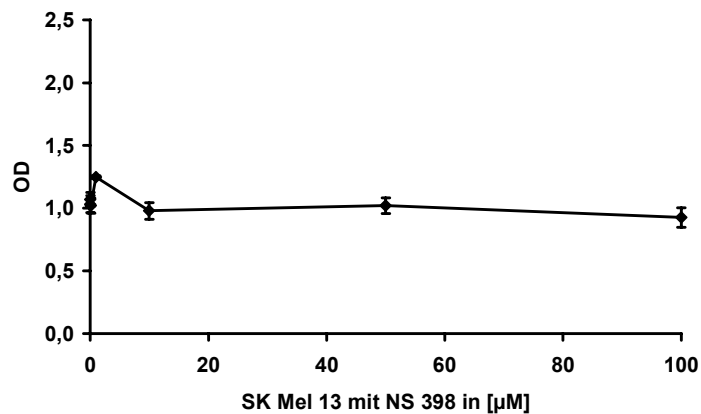
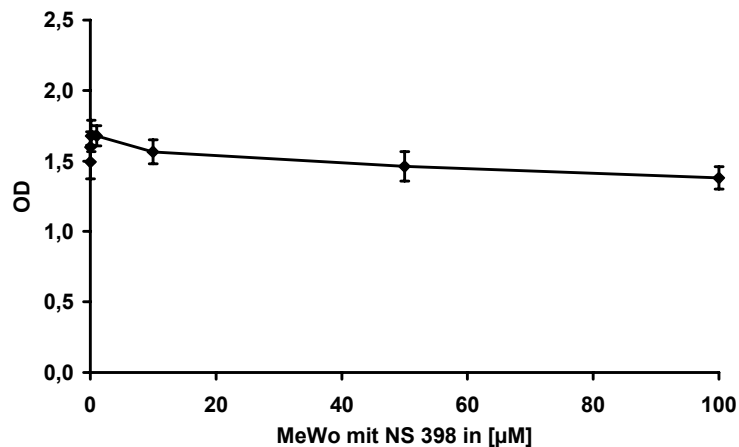


Abbildung 14: Relative Invasionshemmung in Zusammenhang mit der relativen PGE₂-Synthesehemmung.

4.5 Proliferationseinfluss von NS 398 und PGE2

Die Proliferation der sechs Melanomzelllinien änderte sich unter Inkubation mit dem COX-2-spezifischen Inhibitor NS 398 nicht. Die verwendeten Konzentrationen von 0,1 μM bis 100 μM zeigten keine Einfluss auf die Proliferation über einen Zeitraum von 96 Stunden.



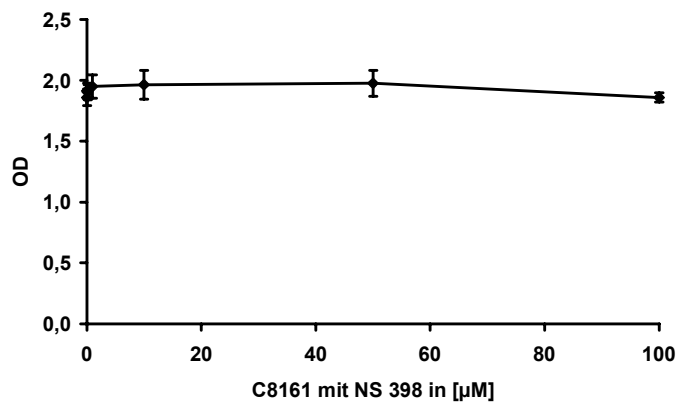
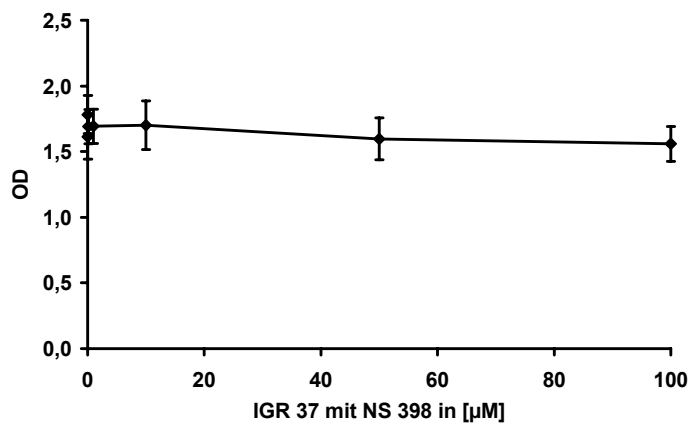
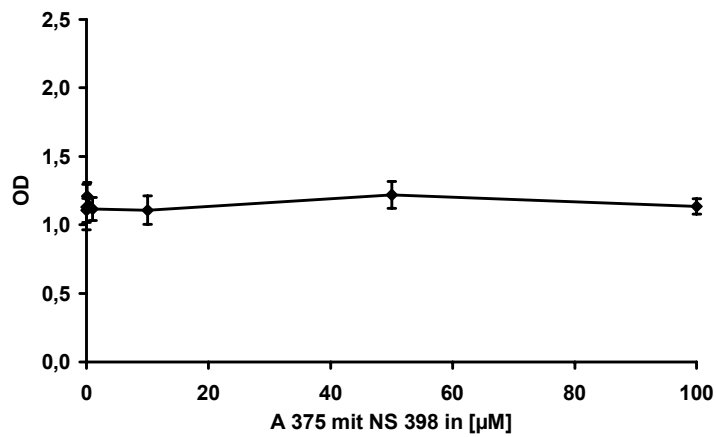
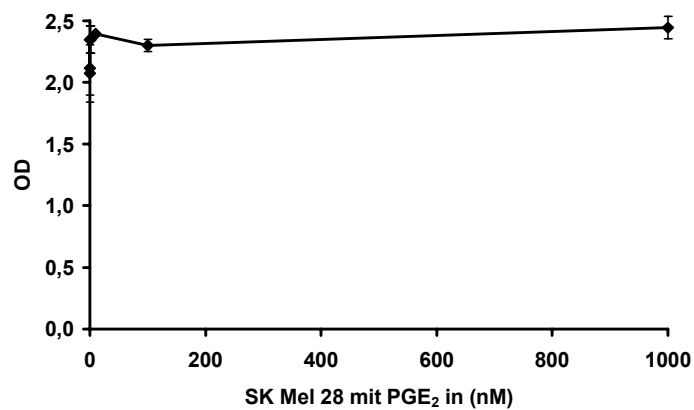
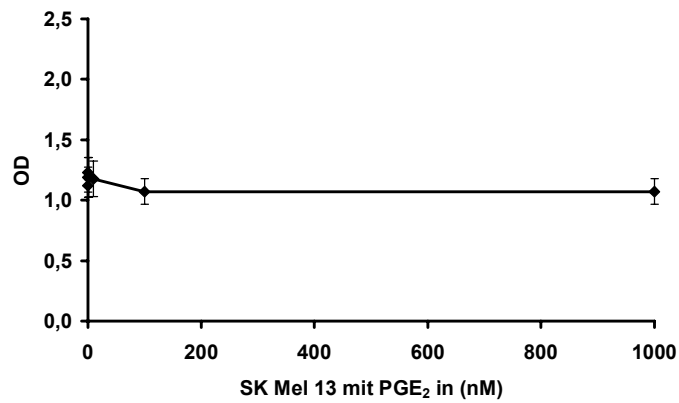
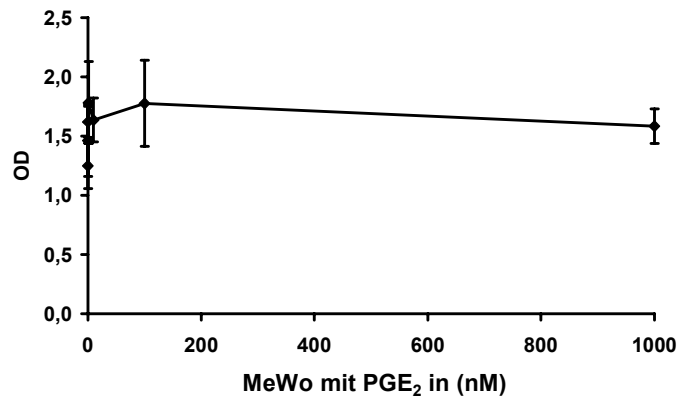


Abbildung 15: Proliferationseinfluss von NS 398 (0,1µM bis 100µM) nach 72 Stunden auf sechs verschiedene Melanomzelllinien in drei unabhängigen Experimenten.

Unter Einfluss von PGE₂ in verschiedenen Konzentrationen zeigte sich ebenfalls eine konstante Proliferation.



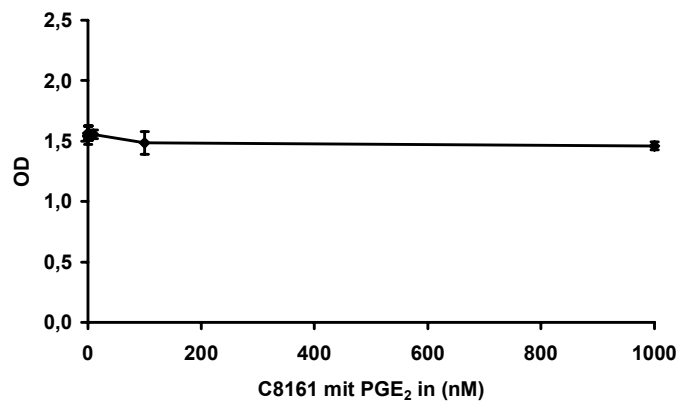
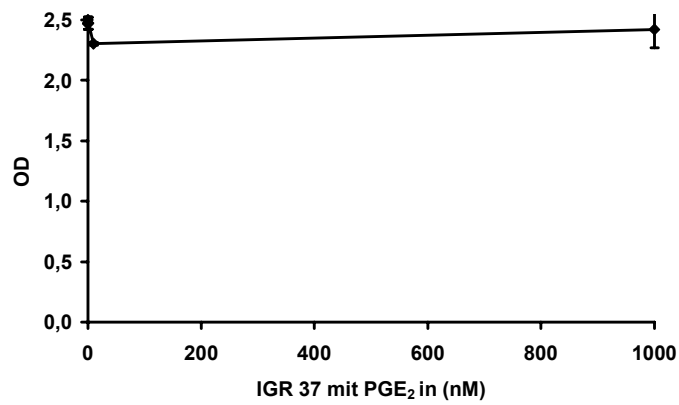
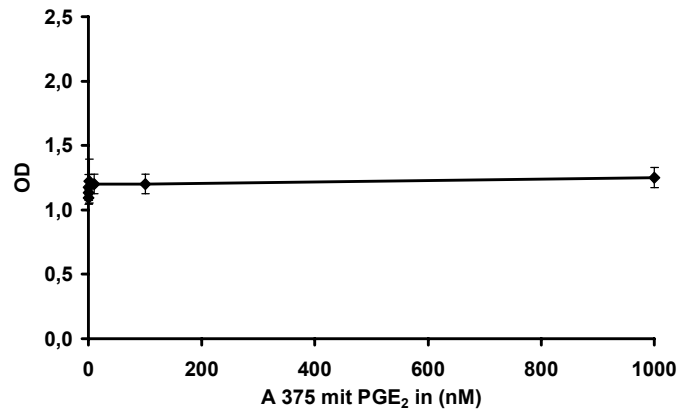


Abbildung 16: Proliferationseinfluss von PGE₂ (0,01 bis 1000 nM) nach 96 Stunden auf sechs verschiedene Melanomzelllinien in drei unabhängigen Experimenten.

4.6 NS 398 und MMP-2 und -9

Die relative gelatinolytische Aktivität des Überstandes des Invasionsassays wurde im Zymogramm bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Es zeigte sich keine signifikante Änderung der Aktivität der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 durch den COX-2-spezifischen Inhibitor NS 398.

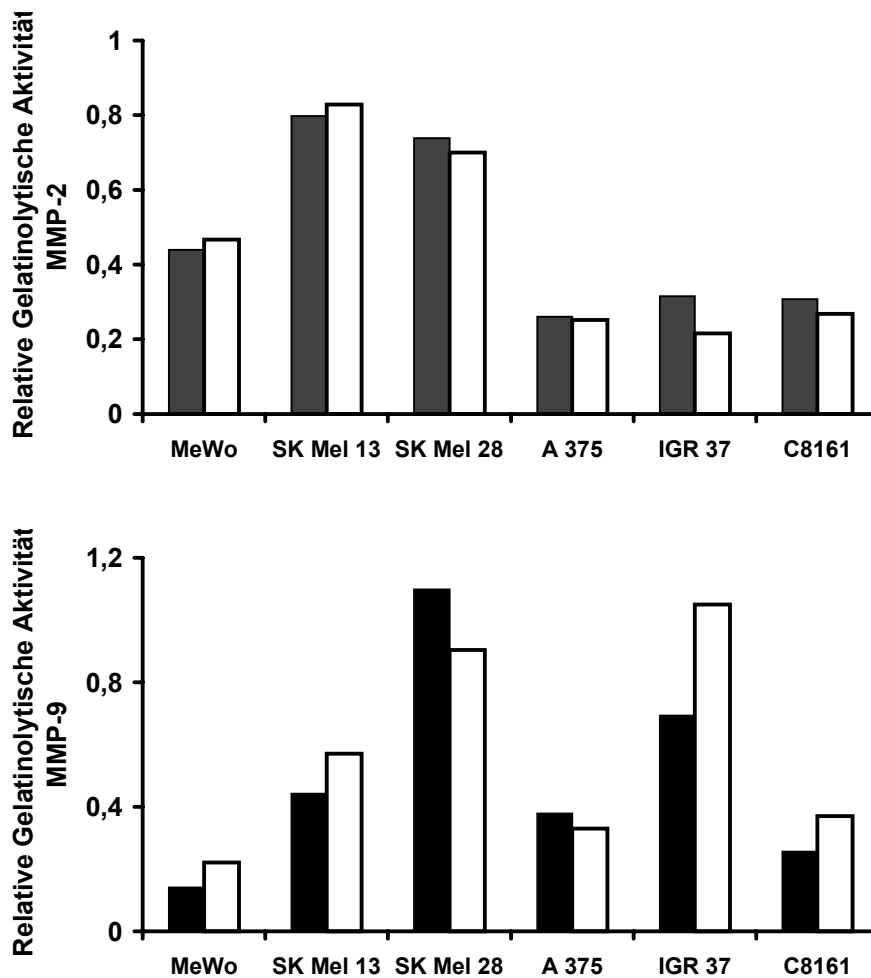


Abbildung 17: Relative gelatinolytische Aktivität der MMP-2 und MMP-9 ohne (schwarz) und mit (weiß) Inkubation von NS 398, in einen Einzelexperiment.

5 Diskussion

Die gestörte Wachstumskontrolle ist ein Charakteristikum autonomen Tumorwachstums. Benigne Tumoren wachsen lokalisiert in ihrem Ursprungsgebiet. Maligne Tumoren hingegen haben die Eigenschaft das umgebende Gewebe zu infiltrieren und die Wand von Lymph- oder Blutgefäßen zu durchbrechen. Diese Vorgänge sind Voraussetzung für eine Metastasierung und schränken die Erfolgsrate einer kurativen therapeutischen Strategie ein.

Die COX-2 beeinflusst verschiedene Prozesse des Wachstums und der Metastasierung maligner epithelialer Tumoren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob durch eine spezifische pharmakologische Inhibition der COX-2 auch das Verhalten nichtepithelialer Tumoren, wie das des malignen Melanoms, zu beeinflussen ist.

Welche Schlussfolgerungen können aus den Ergebnissen unter Beachtung schon bekannter Modelle gezogen werden ?

5.1 Expression von COX-2 Protein in Melanomzelllinien

Obwohl aus der Literatur bekannt ist, dass verschiedene Karzinome (siehe Tab. 6) und auch davon abgeleitete Zelllinien (4/7 Kolon-, 2/3 Lungen-, 5/7 Mamma- und 1/3 Prostatakarzinomzelllinien, **Hong et al. 1999**) die COX-2 exprimieren, gibt es zum malignen Melanom bisher keine Studie.

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis der COX-2 in allen untersuchten Melanomzelllinien. Diese *in vitro* Daten konnten durch immunhistochemische Untersuchungen an Patientenproben von malignen Melanomen durch unsere Arbeitsgruppe bestätigt werden. 26 von 28 (92%) der untersuchten malignen Melanome zeigten eine deutliche Immunpositivität für die COX-2. Dagegen exprimierten Naevuszell-Naevi dieses Enzym nicht (**Denkert et al. 2001**).

Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass die untersuchten Melanomzellen die COX-1 im Gegensatz zur COX-2 vergleichsweise gering bilden.

5.1.1 Ursachen der erhöhten COX-2 Expression in malignen Tumoren

Wie einleitend bemerkt, wird die COX-2 normalerweise nicht konstitutiv exprimiert. Zytokine wie IL-1 β und TNF- α bewirken eine Induktion des Enzyms. Eine Übersicht über die in die Expressionsregulation involvierten Signalwege gibt die Abb. 18. Folgende experimentelle Ansätze gaben Hinweise auf die Bedeutung der aufgeführten Mediatoren:

1. **Sheng et al. 1996** zeigten, dass die Zugabe von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) eine durch PD 98059, einem hochspezifischen Inhibitor der p42/p44 MAP-Kinase, hemmbare COX-2 Induktion bewirkte.
2. Die gleiche Arbeitsgruppe konstatierte auch eine erhöhte COX-2 Expression in Rat-1 Fibroblasten nach Transfektion mit aktivem Ha-Ras. PD 98059 supprimierte auch diese COX-2 Induktion.
3. Transfektion von Plasmiden mit dominant negativen Kinasemutanten offenbarte die Bedeutung zweier MAP-Kinase Signalwege, der JNK-Kinase und der p42/p44 MAP-Kinase, für die COX-2 Induktion (**Reddy et al. 2000**).
4. In Neuroblastomzellen ist auch die p38 MAP-Kinase in die Induktion der COX-2 involviert (**Fiebich et al. 2000**).
5. **Shao et al. 2000** zeigten, dass die Expression der COX-2 in kolorektalen Karzinomzellen unter Kontrolle der MAP-Kinase Signalwege steht. Die Halbwertszeit der COX-2 beträgt 3,5 – 8h, wobei der Abbau durch Proteolyse mit Ubiquitin erfolgt.
6. Aktiviertes Ras erhöht MAPK-vermittelt neben der COX-2 auch die Expression der Phospholipase A₂. Dieses Enzym löst Arachidonsäure aus seinen Phospholipidspeichern und macht sie somit als Substrat der COX-2 verfügbar (**Heasley et al. 1997**).
7. Das COX-2 Produkt PGE₂ kann über seinen membranständigen Rezeptor wahrscheinlich cAMP-abhängig die COX-2 Expression in einer Art selbstverstärkenden Regelkreis steigern (**Tjandrawinata et al. 1997, Hinz et al. 2000**).
8. Phorbolester wie TPA induzieren PKC-abhängig die COX-2 (**Milpeix et al. 1997**).

9. Der Transkriptionsfaktor NF-kappaB bindet an den COX-2 Promoter und leitet die Transkription der COX-2 ein (**Newton et al. 1997**).
10. Aktivierung der IκB Kinase (IKK) und Degradation des inhibierenden IκB Proteins vom zytosolischen NF-kappaB Komplex sind für die NF-kappaB Aktivierung essentiell und erfolgen durch reaktive Sauerstoffspezies (**Baeuerle 1998**).
11. NSAID können NF-kappaB inhibieren (**Kopp and Ghosh 1994**).
12. PGJ₂ als PPARγ Agonist kann die COX-2 Expression supprimieren. Dies könnte ein negatives Feedbacksystem sein, indem das COX-Produkt PGJ₂ die Menge des eigenen Enzyms kontrolliert (**Inoue et al. 2000**).

Eine Fehlregulation dieser Signalwege könnte zu einer konstitutiven Expression der COX-2 in malignen Tumoren wie auch dem Melanom führen.

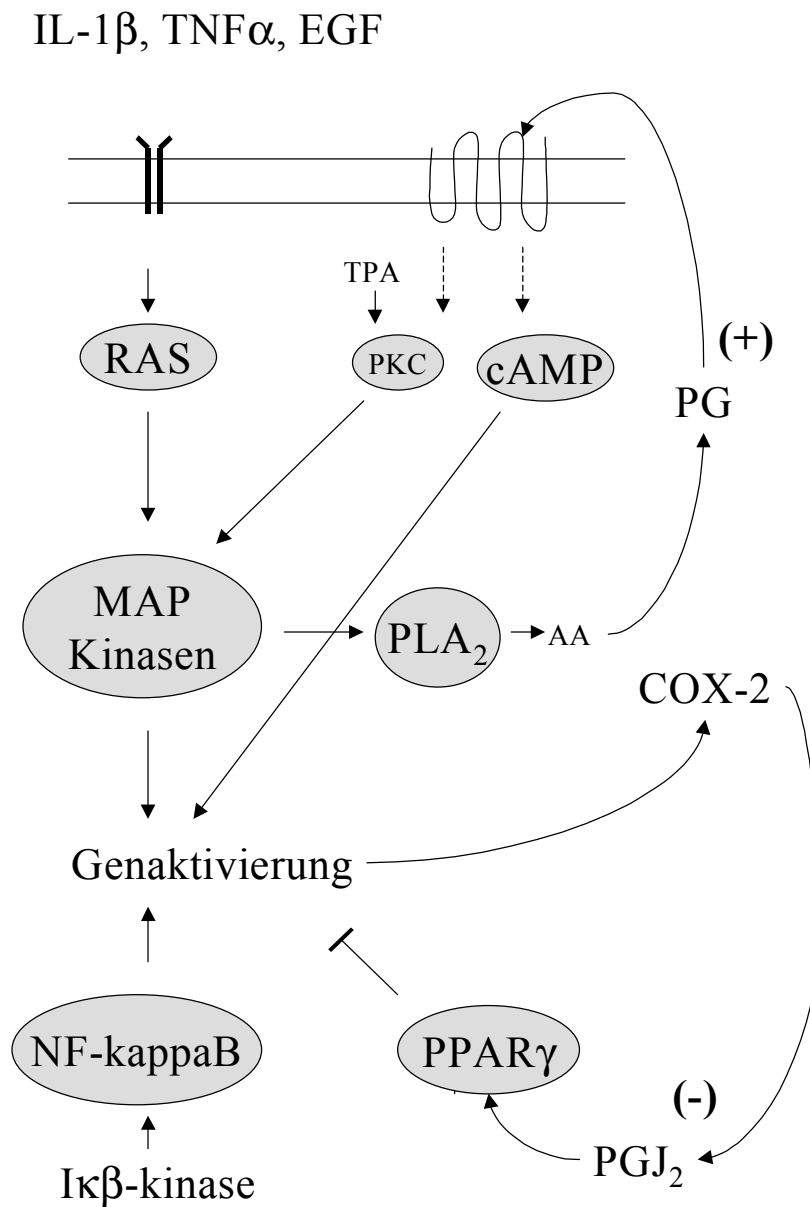


Abbildung 18: Modell der Genregulation der COX-2.

Neben der gestörten Regulation der COX-2 Transkription könnte andererseits eine Genamplifikation des COX-2 Locus für den erhöhten COX-2 Nachweis im Tumorgewebe verantwortlich sein. **Bastian et al. 1998** zeigten in einer CGH Analyse von Melanomen eine 1q Amplifikation in 8/32 Proben (25%).

5.2 PGE₂-Biosynthese in Melanomzelllinien

Um die Funktionsfähigkeit der COX-2 zu verifizieren, erfolgte die immunologische Detektion von PGE₂, welches im Überstand in Konzentrationen von 0,1 bis 1 ng/10⁵ Zellen nachweisbar war. In der Literatur gibt es bisher keine quantitativen Angaben zur PGE₂-Synthese in Melanomzellen. Kolorektale Karzinomzelllinien (HCA-7) produzieren dagegen weit mehr PGE₂ (15 bis 27 ng/ml, **Chinery et al. 1998**, **Sheng et al. 1998**).

Hinweise wonach die COX-2 hauptsächlich an der Synthese von PGE₂ beteiligt ist, erhält man aus folgenden Beobachtungen:

1. Die konzentrationsabhängige Hemmung der PGE₂-Biosynthese durch den COX-2 spezifischen Inhibitor NS 398 ergab eine IC₅₀ von 6 µM. Dieser Wert liegt in der Nähe der in der Literatur angegebenen IC₅₀ von NS 398 mit 1,77 µM (**Barnett et al. 1994**). Somit dürfte die erzielte PGE₂ Suppression auf der Hemmung der COX-2 und nicht der COX-1 beruhen, denn die IC₅₀ von NS 398 für die COX-1 liegt bei 75µM (**Barnett et al. 1994**).
2. NS 398 in einer Konzentration von 50µM unterdrückte die PGE₂-Biosynthese um etwa 90%, was auf eine partielle Hemmung der COX-1 zurückzuführen ist. Die nicht-hemmbar Restproduktion von 50 bis 100 pg/10⁵ Zellen stammt von der COX-1.

5.3 Proliferationseinfluss von NS 398 und PGE₂

Die Wirkung von NS 398 auf Proliferation und Invasion wurde *in vitro* überprüft. NS 398 hatte in Konzentrationen bis 100µM keinen Einfluss auf die Proliferation. Es liegen zwar keine Daten zum *in vitro* Proliferationseinfluss von COX-2-spezifischen Inhibitoren in Melanomen vor, die Ergebnisse sind aber vereinbar mit *in vitro* Ergebnissen von **Cahlin et al. 2000**. In dieser Studie konnten COX-Inhibitoren die Größe von Melanomen der Maus nicht verringern. Ebenfalls keinen Proliferationseffekt erzielten **Murphy et al. 1997** und **Hong et al. 1999** in einem Panel verschiedener Karzinomzellen (Tab.5). In der Untersuchung von Hong bewirkten interessanterweise die Lipxygenase-Inhibitoren eine signifikante Zellwachstumshemmung, nicht aber die COX-Inhibitoren. Die konstante Proliferation der Melanomzellen unter NS 398 ist konträr zu mehreren Studien an verschiedenen Karzinomzellen (Tab.5). NS 398 bewirkte eine 50%-ige

Proliferationshemmung in Konzentrationen von 80 bis 100µM an kolorektalen, oesophagealen und prostatistischen Karzinomzellen.

Auch PGE₂ (bis 1µM) zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation. Somit kann ein möglicher kompensierender Proliferationseffekt von NS 398 oder PGE₂ auf die folgenden Ergebnisse ausgeschlossen werden.

5.4 Inhibition der Matrigelinvasion durch NS 398

In diesem Experiment mussten die Tumorzellen eine 50µm dicke Matrigelschicht penetrieren, welche eine natürliche Basalmembran simulierte. Mit 50µM NS 398 konnte eine signifikante Invasionsreduktion erzielt werden. Die als besonders invasiv beschriebene Zelllinie C 8161 (**Welch et al. 1991**) wurde sogar um 86 % in ihrer Invasivität gehemmt. Die anderen Zelllinien zeigten ein geringere aber reproduzierbare und signifikante Invasionshemmung durch NS 398. Damit liegen erstmals Daten vor, die eine Invasionshemmung humaner Melanomzellen durch COX-2-spezifische Inhibitoren zeigen. (**Reich et al. 1996**) supprimierten mit dem nichtspezifischen NSAID Indomethacin in einer murinen Melanomzelllinie die *in vitro* Invasion und die Expression der Gelatinase MMP-2. Die Expression und Funktion der COX-2 wurden in dieser Studie allerdings nicht untersucht.

Um ebenfalls einen wesentlichen Mechanismus der Matrixdegradation zu untersuchen, wurde die gelatinolytische Aktivität des Überstandes des Invasionsassays bestimmt. Im Gegensatz zu **Reich et al. 1996**, welche eine quantitative Verminderung der MMP-2 unter Indomethacin beschrieben, konnte in der vorliegenden Arbeit unter NS 398 keine Änderung der funktionellen Aktivität der beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 festgestellt werden. Somit dürfte der Einfluss der COX-2 auf die Invasion entweder über andere matrixdegradierende Enzyme oder über andere Komponenten der Invasion wie Adhäsion und Migration vermittelt sein.

5.4.1 Prostaglandin-unabhängiger Mechanismus

Die molekularen Mechanismen wodurch NS 398 die Invasionshemmung verursacht, sind bisher nicht geklärt. Es stellt sich die Frage, ob die Prostaglandine als Produkte der COX ursächlich für die verminderte Invasivität sind. Folgende Ergebnissen sprechen gegen einen PGE₂-vermittelten Mechanismus:

- I. Die exogene Substitution von PGE₂ konnte die Invasionshemmung durch NS 398 nicht wieder aufheben. Dabei wurden Konzentrationen von PGE₂ bis zu 100 nM, also im dreißigfachen Bereich der gemessenen Eigensynthese der Melanomzellen, verwendet (2,8 nM).
- II. Die Konzentration des Inhibitors zur Invasionshemmung war etwa 10 mal höher als die IC₅₀ für die PGE₂-Synthesehemmung der COX-2. Diese Diskrepanz lässt ebenfalls an einen anderen Wirkmechanismus denken. Die verwendeten 50 µM NS 398 hemmten die COX-1 nur partiell, deren IC₅₀ bei 75 µM liegt.
- III. Es bestand keine Korrelation zwischen der Hemmung der Invasivität und der Hemmung der PGE₂ Produktion.

Die molekulare Basis der Invasionsregulation durch die COX-2 bedarf weiterer Abklärung. Die vorliegenden Daten sprechen dafür, dass COX-Inhibitoren neben ihrem Hauptziel der COX weitere zelluläre Targets besitzen.

Ein solches non-COX-Target ist PPARδ, welches direkt durch den NSAID Sulindac Sulfon gehemmt werden kann (**He et al. 1999**)**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** NSAIDs können über diesen nukleären Rezeptor direkt die Transkription beeinflussen und völlig unabhängig von der COX wirken. Es bliebe zu zeigen, ob auch COX-2-spezifische Inhibitoren die PPARδ-Aktivität reduzieren.

In diesem Zusammenhang muss man nochmals erwähnen, dass das COX-Produkt PGI₂ ein PPARδ Agonist ist (**Gupta et al. 2000**). Somit ist eine synergistische PPARδ-Hemmung einerseits direkt und andererseits indirekt über die Hemmung des COX-generierten PGI₂ durch NSAIDs denkbar.

5.5 Ausblick

Das vielversprechende Konzept der Chemoprävention ist mit dem Einsatz von Sulindac Sulfon und auch von Celebrex bei Patienten mit FAP zum ersten Mal in der Praxis erfolgreich angewandt worden (**Steinbach et al. 2000**). Dabei ist ein COX-2-spezifischer Inhibitor einem unspezifischen Inhibitor bei gleicher antitumoröse Wirksamkeit überlegen, weil die Rate an gastroduodenalen Ulzera vermindert ist (**Laine et al. 1999**). Einschränkend muss man jedoch feststellen, dass es bisher mit keinem COX-Inhibitor gelungen ist, das Tumorwachstum vollständig zu verhindern. Zusätzlich besteht auch bei COX-2-spezifischen Inhibitoren eine potentielle Toxizität in der Langzeitanwendung. Es bietet sich also an, COX-2-spezifische Inhibitoren in Kombination mit anderen Wirkstoffen zu verwenden. Die kürzlich erschienene Arbeit von **Torrance et al. (2000)** beschreibt eine vollständige Hemmung der Polypenentwicklung in der Hälfte von MIN Mäusen durch eine Kombination von Sulindac Sulfon und dem Inhibitor des EGF-Rezeptors EKB-569. Dieser Ansatz erscheint sinnvoll, da wie oben beschrieben, EGF die Expression der COX-2 induzieren kann. Dieses Beispiel verdeutlicht wie wichtig es ist, die molekularen Mechanismen zu verstehen, um eine erfolgreiche synergistische antitumoröse Kombinationstherapie zu entwickeln. Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit richtete sich darauf, den chemopräventiven Ansatz auch auf einen adjuvant therapeutischen auszudehnen. Die Ergebnisse zeigen, dass die weiteren Untersuchungen COX-2-spezifischer Inhibitoren in einer Kombinationstherapie auch bei fortgeschrittenen malignen Melanomen sinnvoll erscheinen.

6 Zusammenfassung

Die induzierbare Isoform der Cyclooxygenase, COX-2, spielt bei der Entstehung von Karzinomen eine Rolle. NSAID und COX-2-spezifische Inhibitoren wirkten im murinen Modell der Tumorinduktion chemopräventiv und hemmten *in vitro* Tumorzellproliferation, Tumorzellinvasion und Tumorangiogenese.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Bedeutung der COX-2 für Proliferation und Invasion von malignen Melanomen, als Vertreter nichtepithelialer Tumoren, zu untersuchen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Expression der beiden Isoformen der COX in sechs Melanomzelllinien analysiert. Dabei zeigte sich eine konstitutive Expression der COX-2 in allen untersuchten Melanomzelllinien. Die Menge an COX-1 Protein war vergleichsweise gering. Darüber hinaus wurde der Nachweis der Funktionsfähigkeit des Enzyms geführt, indem PGE₂ als wesentliches Produkt der COX-2 im Überstand der Melanomzelllinien mittels eines spezifischen ELISAs sowohl unter Basalbedingungen als auch unter Zugabe des Substrates Arachidonsäure detektiert wurde. Der COX-2-spezifische Inhibitor NS 398 hemmte konzentrationsabhängig die PGE₂ Biosynthese. Die IC₅₀ von NS 398 für die COX-2 wurde mit 6µM bestimmt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten unter Zuhilfenahme geeigneter Funktionsassays die Wirkungen einer pharmakologischen Blockierung der COX-2 auf Proliferation und Invasion der Melanomzelllinien *in vitro* studiert werden. Dabei ließ sich zeigen, dass NS 398 die Invasion hemmte, ohne die Proliferation zu beeinflussen. Die Invasionshemmung der einzelnen Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war dabei unterschiedlich und variierte zwischen 46 - 86 %. Dabei blieb unter NS 398 die Aktivität der beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 konstant, so dass ein Einfluss auf diese Effektoren der Degradation ausgeschlossen werden kann.

Des weiteren sollte der molekulare Mechanismus der Invasionshemmung hinsichtlich der PGE₂-Abhängigkeit untersucht werden. Folgende Ergebnisse sprechen gegen einen PGE₂-vermittelten Effekt:

- I. Die exogene Substitution von PGE₂ konnte die Invasionshemmung nicht wieder aufheben.
- II. Die zur Invasionshemmung benötigte Konzentration von NS 398 war etwa 10 mal höher als die IC₅₀ für die PGE₂ Synthesehemmung der COX-2.
- III. Es bestand keine Korrelation zwischen der Hemmung der Invasivität und der Hemmung der PGE₂ Produktion zwischen den einzelnen Melanomzelllinien.

Der COX-2-spezifische Inhibitor hemmt die Invasion von Melanomzellen PGE₂-unabhängig. Daraus lässt sich ableiten, dass COX-2-spezifische Inhibitoren neben der COX-2 wahrscheinlich zusätzliche molekulare, sog. non-COX-Targets, besitzen.

Es bleibt zu klären inwieweit diese *in vitro* Ergebnisse auf die Situation *in vivo* übertragbar sind und ob COX-2-spezifische Inhibitoren, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen, die Prognose von Melanompatienten auch in fortgeschrittenen Stadien verbessern können.

7 Literaturverzeichnis

- Anderson et al. 1996:** Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakon PC, Gregory SA: selective inhibition of cyclooxygenase(COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin-6 in rat adjuvant arthritis.. J Clin Invest. 1996, 97, S.2672,
- Baeuerle 1998:** Baeuerle PA: IkappaB-NFkappaB structures: at the interface of inflammation control.. Cell. 1998, 95, S.729,
- Barnett et al. 1994:** Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J: Purification, characterisation and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system.. Biochem Biophys Acta. 1994, 1209, S.130,
- Bastian et al. 1998:** bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Brocker EB, Pinkel D: Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization.. Cancer Res. 1998, 58, S.2170,
- Bregmann et al. 1986:** Bregmann MD, Funk C, Fukushima M : Inhibition of human melanoma growth by prostaglandin A,D, and J analogues.. Cancer Res. 1986, 46, S.2740,
- Breslow 1975:** Breslow A: Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I melanomas.. Ann Surg. 1975, 182, S.572,
- Brune et al. 2000:** Brune K, Kalden J, Zacher J, Zeilhofer HU: Selektive Inhibitoren der Zycklooxygenase-2.. Dt. Ärzteblatt. 97, 1540,
- Cahlin et al. 2000:** Cahlin C, Gelin J, Delbro D, Lnnroth C, Doi C, Lundholm K: Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on tumor growth in mouse models with and without cancer cachexia related to prostanoids. . Cancer Res. 2000, 60, S.1742,
- Cao et al. 1997:** Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y: Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in rat brain.. Am J Physiol. 1997, 272, S.1712,

- Chan et al. 1999:** Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2 expression is upregulated in squamous cell carcinoma of the head and neck.. *Cancer Res.* 1999, *59*, S.991,
- Chinery et al.:** Chinery R, Beauchamp RD, Shyr Y, Kirkland SC, Coffey RJ, Morrow JD: Antioxidants reduce cyclooxygenase-2 expression, prostaglandin production and proliferation in colorectal cancer cells.. *Cancer Res.* 1998, *58*, S.2323,
- Chinery et al. 1999:** Chinery R, Coffey RJ, Graves-Deal R, Kirkland SC, Sanchez SC, Zackert WE, Oates JA, Morrow JD: Prostaglandin J2 and 15-desoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induce proliferation of cyclooxygenase-depleted colorectal cancer cells. . *Cancer Res.* 1999, *59*, S.2739,
- Chulada et al. 2000:** Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O, Langenbach R: Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice.. *Cancer Res.* 2000, *60*, S.4705,
- Clark et al. 1989:** Clark WH, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Halpern AC: A model predicting survival in stage I melanoma based upon the tumor progression.. *J natl Cancer Inst.* 1989, *81*, S.1893,
- Coffey et al. 1997:** Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, Graves-Deal R, Chinery R, Kirkland SC, DuBois RN, Jetton TL, Morrow JD: Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, mitogenesis in polarizing colon cancer cells.. *Proc Natl Acad Sci.* 1997, *94*, S.657,
- Denkert et al. 2001:** Denkert C, Kobel M, Berger S, Siegert A, Leclerc A, Trefzer U, Hauptmann S: Expression of cyclooxygenase-2 in human malignant melanoma.. *Cancer Res.* 2001, *61*, S.303,
- DeWitt and Smith 1995:** De Witt D, Smith WL: Yes, but do they still get headaches?. *Cell.* 1995, *83*, S.345,
- Dimberg et al. 1999:** Dimberg J, Samuelsen A, Hugander A, Söderkvist P: Differential expression of cyclooxygenase-2 in human colorectal cancer.. *Gut.* 1999, *45*, S.730,

- DuBois et al. 1998:** DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van de Putte LB, Lipsky PE: Cyclooxygenase in biology and disease.. *FASEB J.* 1998, *12*, S.1063,
- Durant et al. 1988:** Durant D, Duval D, Homo-Delarche F: Mouse embryo fibroblasts in culture: characterisation of arachidonic acid metabolism during early passages.. *Prostaglandins.* 1988, *32*, S.129,
- Eberhart et al. 1994:** Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A: Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in human colorectal adenomas and adenomcarcinomas.. *Gastroenterology.* 1994, *107*, S.1183,
- Eberle et al. 1993:** Eberle J, Krasagakis K, Garbe C, Orfanos CE: Proliferation and morphology of melanoma cellss and benign human melanocytes under varying culture conditions.. *Melanoma Res.* 1993, *3*, S.107,
- Elder et al. 1997:** Elder DJ, Halton DE, Hague A, Paraskeva C: Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression.. *Clin Can Res.* 1997, *3*, S.1679,
- Fiebich et al. 2000:** Fiebich BL, Mueksch B, Boehringer M, Hull M: Interleukin-1beta induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) synthesis in human neuroblastoma cells: involvement of the p38 mitogen-activated kinase and nuclear factor-kappaB.. *J Neurochem.* 2000, *75*, S.2020,
- Fogh et al. 1977:** Fogh J, Fogh JM, Orfeo T: One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.. *J Natl Cancer Inst.* 1977, *59*, S.221,
- Furstenberger et al. 1989:** Furstenberger G, Gross M, Marks F: Eicosanoids and multistage carcinogenesis in NMRI mouse skin: role of prostaglandins E and F in conversion (first stage of tumor promotion) and promotion (second stage of tumor promotion).. *Carcinogenesis.* 1989, *10*, S.91,
- Futaki et al. 1994:** Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higushi S, Otomo S: NS 398, a new antiinflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/ cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro.. *Prostaglandins.* 1994, *47*, S.55,

- Giard et al. 1973:** Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dózik H, Parks WP: In vitor cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from series of solid tumors.. J Natl Cancer Inst. 1973, 51, S.1417,
- Gilroy et al. 1999:** Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clarke MJ, Willoughby DA: Inducilbe cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties.. Nat Medicine. 1999, 6, S.696,
- Gottlieb 1999:** Gottlieb S: COX 2 inhibitors might be useful in cancer prevention.. BMJ. 1999, 319, S.1155,
- Gupta et al. 2000:** Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK, DuBois RN: Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliefator-activated receptor delta in colorectal cancer.. Proc Natl Acad Sci. 2000, 97, S.13275,
- Hanif et al. 1996:** Hanif R, Pittas A, feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Shiff SI, Rigas B: Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway.. Biochem Pahrmacol. 1996, 26, S.237,
- He et al. 1999:** He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW : PPARd is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.. Cell. 1999, 99, S.335,
- Heasley et al. 1997:** Heasley LE, Thaler S, Nicks M, Price B, Skorecki K, Nemenhoff RA: Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras in human no-small cell lung cancer.. J Biol Chem. 1997, 272, S.14501,
- Hida et al. 1998:** Hida T, Yatabe Y, Achiwa H. Muramatsu H, Kazaki K, Nakamura S, Ogwa M, Takahashi T: Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas.. Cancer Res. 1998, 58, S.3761,
- Hinz et al. 2000:** Hinz B, Brune K, Pahl A: Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin(2) and nonsteroidal anti-inflammatory drugs.. Biochem Biophys Res Commun. 2000, 278, S.790,

- Hong et al. 1999:** Hong SH, Avis I, Vos MD, Martinez A, Treston AM, Mulshine JL:
Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth of selective biochemical inhibitors.. *Cancer Res.* 1999, *59*, S.2223,
- Honn et al. 1992:** Honn KV, Tang DG, Chen YO: Platelets and cancer metastasis: more than an epiphenomenon.. *Semin Throm Hemost.* 1992, *18*, S.390,
- Huang et al. 1998:** Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Dubinett SM: Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2 dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages.. *Cancer Res.* 1998, *58*, S.1208,
- Hubbard et al. 1988:** Hubbard WC, Alley MC, McLemore TL, Boyd MR: Profiles of prostaglandin biosynthesis in sixteen established cell lines derived from human lung, colon, prostate, and ovarian tumors.. *Cancer Res.* 1988, *48*, S.4770,
- Hwang et al. 1998:** Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E: Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer.. *J natl Cancer inst.* 1998, *90*, S.455,
- Imamura et al. 1994:** Imamura H, Takao S, Aikou T: A modified invasion-3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay for quantitating tumor cell invasion.. *Cancer Res.* 1994, *54*, S.3620,
- Inaba et al. 1999:** Inaba A, Uchiyama T, Oka M : Role of prostaglandin E2 in rat colon carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 1999, *46*, S.2347,
- Inoue et al. 2000:** Inoue H, Tanabe T, Umesono K: Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma.. *J Biol Chem.* 2000, *275*, S.28028,
- Jones et al. 1999:** Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levi E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS: Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing.. *Nat Medicine.* 1999, *5*, S.1418,
- Kargmann et al. 1995:** Kargmann S, O'Neill G, Vickers P, Evans JF, Mancini JA, Jothy S: Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 in human colon cancer. . *Cancer Res.* 1995, *55*, S.2556,

- Kawamori et al. 1998:** Kawamori T, Rao CV, Seiber K, Reddy BS: Chemopreventive activity of Celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis.. *Cancer Res.* 1998, 58, S.409,
- Kerbel and Man 1984:** Kerbel RS, Man MS: Single-step selection of unique human melanoma variants displaying unusually aggressive metastatic behavior in nude athymic mice.. *Invasion Metastasis.* 1984, 4, S.31,
- Kersten et al. 2000:** Kersten S, Desvergne B, Wahli W: 2000. Roles of PPARs in health and disease.. *Nature*, 405, S.421,
- Koga et al. 1999:** Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawagushi T, Tanigushi E, Sasatomi K, Sata M : Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation.. *Hepatology.* 1999, 29, S.688,
- Kopp and Ghosh 1994:** Kopp E, Ghosh S: Inhibition of NF-kappaB by sodium salicylate and aspirin.. *Science.* 1994, 265, S.956,
- Laine et al. 1999:** Laine L, Harper S, Simon T, bath R, Johanson J, Schwartz H, Stern S, Quan H, Bolognese J: A randomized trial comparing the effect of rofecoxib, a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, with that of ibuprofen on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis. . *Gastroenterology.* 1999, 117, S.776,
- Langenbach et al. 1999:** Langenbach R, Loftin CD, Lee CA, Tian H: Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions.. *Biochem Pharmacol.* 1999, 58, S.1237,
- Lehmann et al. 1997:** Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA: Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs.. *J Biol Chem.* 1997, 272, S.3406,
- Lim et al. 1999:** Lim H, Gupta RA, Ma W, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK: Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta.. *Gene Dev.* 1999, 13, S.1561,

- Liu et al. 1998:** Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC: NS 398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and downregulates bcl-2 expression in LNCaP cells.. *Cancer Res.* 1998, 58, S.4245,
- Lynch et al. 1978:** Lynch NR, Castes M, Astoin M, Salomon JC: Mechanism of inhibition of tumor growth by aspirin and indomethacin. . *Br J Cancer.* 1978, 38, S.503,
- MaKie 1998:** MacKie RM: Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur J Cancer.* 1998, 34, S.3,
- Marnett 1992:** Marnett LJ: Aspirin and potentiell role of prostaglandins in colon cancer.. *Cancer Res.* 1992, 52, S.5575,
- Masferrer et al. 2000:** Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Moore RJ, Seibert K: Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors.. *Cancer Res.* 2000, 60, S.1306,
- Maxwell et al. 1990:** Maxwell BJ, Kelleher D, Keating JJ, McDonald GS, Keeling PW: Enhanced secretion of prostaglandin E2 by tissue fixed macrophages in colonic carcinoma.. *Digestion.* 1990, 47, S.160,
- Milpeix et al. 1997:** Milpeix M, Camacho M, Lopez-Belmonte J, Palacios JM, Vila L: Selective induction of cyclooxygenase-2 activity in the permanent human endothelial cell line HUV-E-C: biochemical and pharmacological characterisation.. *Br J Pharmacol.* 1997, 121, S.171,
- Morita et al. 1995:** Morita I, Schindler M, Regir MK, DeWitt DL, Smith WL: Different intracellular localisations for prostaglandin endoperoxide H synthase -1 and - 2. . *J Biol Chem.* 1995, 270, S.10902,
- Murata et al. 1999:** Murata H, Kawano S, Tsujii S, Shiozaki H, Hori M: Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma.. *Am J Gastroenterol.* 1999, 94, S.451,
- Murphy et al. 1997:** Murphy VJ, Yang Z, Rorison KA, Bladwin GS: Cyclooxygenase-2-selective antagonists do not inhibit growth of colorectal cancer cell lines.. *Cancer Lett.* 1998, 122, S.25,

- Narisawa et al. 1990:** Narisawa T, Kusaka H, Yamazaki Y, Fukaura Y, Wakizaka A: Relationship between blood plasma prostaglandin E2 and liver and lung metastasis in colorectal cancer.. 1990. *Dis Colon Rectum*, 33, S.840,
- Narumiya et al. 1999:** Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikobi F: Prostanoid receptors: structures, properties, and functions.. *Physiol Rev.* 1999, 79, S.1193,
- Newton et al. 1997:** Netwon R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ: Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta.. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997, 237, S.28,
- Nugent et al. 1993:** Nugent KP, Farmer KC, Spitelman AD, Williams CB, Phillips RK: Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adomatous polyposis.. *Br J Surg.* 1993, 80, S.1618,
- Oshima et al. 1996:** Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Evans JF, Taketo MM: Supression of intestinal polyposis in APC-delta 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2).. *Cell.* 1996, 87, S.803,
- Piazza et al. 1995:** Piazza GA, Rahm AI, Krutzsch M, Alberts DS, Pamuku R: Antineoplastic drugs aulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis.. *Cancer Res.* 1995, 55, S.3110,
- Piazza et al. 1997:** Piazza GA, Alberts DS, Hixson LJ, Brendell K, Gross PH: Sulindac sulfone inhibits oxymethane-induced coloncarcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels.. *Cancer Res.* 1997, 57, S.2909,
- Pollard and Luckert 1981:** Pollard M, Luckert PH: Effects of indomethacin on intestinal tumors induced in rats by acetate derivates of dimethylnitrosoamine.. *Science.* 1981, 214, S.558,
- Reddy et al. 2000:** Reddy BS, Hirose Y, Lubet R, Seibert K, Rao CV: Chemoprevetnion of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, Celecoxib, administered during differnet different stages of carcinogenesis.. *Cancer Res.* 2000, 60, S.293,
- Reddy et al. 2000:** Reddy ST, Wadleigh DJ, Herschman HR: Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells.. *J Biol Chem.* 2000, 275, S.3107,

- Reich et al. 1996:** Reich R, Martin GR: Identification of arachidonic acid pathways required for the invasive and metastatic activity of malignant tumor cells.. Prostaglandins. 1996, 51, S.1,
- Rigas et al. 1993:** Rigas B, Goldman IS, Levine L: Altered eicosanoid levels in human colon cancer.. J Lab Clin Med. 1993, 122, S.518,
- Sano et al. 1995:** Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Kondo M, Hla T: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer.. Cancer Res. 1995, 55, S.3758,
- Schafer 1995:** Schafer AI: Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis.. J Clin Pharm. 1995, 35, S.209,
- Shao et al. 2000:** Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, DuBois RN: Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells.. J Biol Chem. 2000, 275, S.33951,
- Sheehan et al. 1999:** Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, Fitzgerald DK, Murray FE: The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer.. JAMA. 1999, 282, S.1254,
- Sheng et al. 1996:** Sheng H, Williams CS, Shao J, Liang P, DuBois RN, Beauchamp RD: Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-Ras oncogene in rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway.. J Biol Chem. 1996, 273, S.22120,
- Sheng et al. 1997:** Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Beauchamp RD, DuBois RN: Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2.. J Clin Invest. 1997, 99, S.2254,
- Sheng et al. 1998:** Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN: Modulation of apoptosis and bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells.. Cancer Res. 1998, 58, S.362,
- Shiota et al. 1999:** Shiota G, Okubo M, Noumi T, Kishimoto Y, Kawasaki H: Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma.. Hepatogastroenterology. 1999, 46, S.407,
- Smith and Marnett 1991:** Smith WL, Marnett LJ: Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis.. Biochem Biophys Acta Lipid Metab. 1991, 1083, S.1,

- Steinbach et al. 2000:** Steinbach G, Lynch PM, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayshi N, Saunders B, shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B: The effect of celecoxib, cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adnomatous polyposis.. N Engl J Med. 2000, 342, S.1946,
- Stringfellow and Fitzpatrick 1979:** Stringfellow DA, Fitzpatrick FA: Prostaglandin D2 controls pulmonary metastasis of malignant melanoma cells.. Nature. 1979, 282, S.76,
- Taketo 1998:** Taketo MM: Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). J Natl Can Inst. 1998, 90, S.1529,
- Thun et al. 1993:** Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flenders WD, Heath CW: Apirin use and risk of fatal cancer.. Cancer Res. 1993, 53, S.1322,
- Tjandrawinata et al. 1997:** Tjandrawinata RR, Dahiya R, Hughes-Fulford M: Induction of cyclooxygenase-2 mRNA by prostaglandin E2 in human prostatic carcinoma cells.. Br J Cancer. 1997, 75, S.1111,
- Torrance et al. (2000):** Torrance CJ, Jackson PE, Montgomery E, Kinzler KW, Vogelstein B, Wissner A, nunes M, Frost P Discafani SM: Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia . Nat Medicine. 2000, 6, S.1024,
- Tsafriri 1995:** Tsafriri A: Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. . Adv Exp Med Biol . 1995, 377, S.1221,
- Tsujii and DuBois 1995:** Tsujii M, DuBois RN: Alteration in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxidase synthase-2.. Cell. 1995, 83, S.493,
- Tsujii et al. 1997:** Tsujii M, Kawano S, DuBois RN: Cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells increases metastatic potential.. Proc Natl Acad Sci. 1997, 94, S.3336,
- Tsujii et al. 1998:** Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN: Cycloxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells.. Cell. 1998, 93, S.705,

- Tucker et al. 1999:** Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Koki AT, Fahey TJ: Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer.. *Cancer Res.* 1999, *59*, S.987,
- Uefuji et al. 1998:** Uefuji K, Ishikura T, Moshizuki H, Shinomya N: Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma.. *J Surg Oncol.* 1998, *69*, S.168,
- Vane 1971:** Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as mechanism of action for aspirin-like drugs.. *Nature.* 1971, *231*, S.232,
- Waddell and Loughry 1983:** Waddell WR, Loughry RW: Sulindac for polyposis of the colon.. *J Surg Oncol.* 1983, *24*, S.83,
- Weinreb and Travo 1984:** Weinreb A, Travo P: Discrimination between human melanoma cell lines by fluorescence anisotropy.. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1984, *20*, S.673,
- Welch et al. 1991:** Welch DR, Bisi JE, Miller BE, Conaway D, Seftor EA, Yohem KH, Gilmore LB, Seftor REB, Nakajima M, Hendrix MJC: Characterisation of a highly invasive and spontaneously metastatic human malignant melanoma cell line.. *Int J Cancer.* 1991, *47*, S.227,
- Wolff et al. 1998:** Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A: Expression of cyclooxygenase in human lung carcinoma.. *Cancer Res.* 1998, *58*, S.4997,
- Xie et al. 1991:** Xie W, Shipman JG, Roberson DL, Eriksen RL, Simmons DL: Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing.. *Proc Natl Acad Sci.* 1991, *88*, S.2692,
- Young et al. 1990:** Young MR, Duffie P, Lozano Y, Young ME, Wright MA: Association of a functional prostaglandin E2 protein kinase A coupling with responsiveness of metastatic Lewis lung carcinoma variants to prostaglandin E2 and to prostaglandin E2 producing non-metastatic Lewis lung carcinoma variants.. *Cancer Res.* 1990, *50*, S.2973,
- Yu et al. 1995:** Yu, Bayona W, Kallen CB: Differential activation of peroxisome proliferator activated receptors by eicosanoids.. *J Biol Chem.* 1995, *270*, S.23975,
- Zhang and DuBois 2000:** Zhang Z, DuBois RN: Par-4, a proapoptotic gene, is regulated by NSAIDs in human colon carcinoma cells.. *Gastroenterology.* 2000, *118*, S.1012,

- Zhang et al. 1999:** Zhang X, Morham SG, Langenbach R, Young DA : Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and cyclooxygenase-null embryo fibroblasts.. J Exp Med. 1999, *190*, S.451,
- Zimmermann et al. 1999:** Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schroer K: Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma.. Cancer res. 1999, *59*, S.198,

8 Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 04.01.2001

Martin Köbel